

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 026**

51 Int. Cl.:

G02B 21/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2006 PCT/NL2006/000497**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2007 WO07040390**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2006 E 06799486 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 1932046**

54 Título: **Microscopio de fluorescencia**

30 Prioridad:

03.10.2005 NL 1030102

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

21.11.2017

73 Titular/es:

**M.M. KLERKS IP HOLDING B.V. (100.0%)
Celsiuslaan 5
5251 ZB Vlijmen, NL**

72 Inventor/es:

**FEY, FRANCISCUS, HENRICUS, ALPHONSUS,
GERARDUS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 643 026 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

Microscopio de fluorescencia

La presente invención se refiere a un microscopio de fluorescencia.

5 En particular, la presente invención se refiere a un microscopio de fluorescencia que comprende una carcasa con una fuente de luz de excitación que está diseñada para emitir luz de excitación, un medio de filtración que separa la luz de excitación de la luz fluorescente generada por una sustancia fluorescente, un lente objetivo, un soporte de sustrato, un detector de luz sensible a la ubicación y una lente de formación de imágenes para el detector de luz sensible a la ubicación.

10 Los microscopios de fluorescencia de este tipo se usan ampliamente en estudios de fluorescencia en los que se estudia una muestra o espécimen fluorescente. Si se requiere, a una muestra que no fluoresce se puede proporcionar una sustancia fluorescente. Si dicha muestra o espécimen se irradia con luz adecuada, generalmente pero no exclusivamente luz visible o luz ultravioleta, la sustancia fluorescente en la muestra se iluminará con luz fluorescente que tiene una longitud de onda más larga que la luz de excitación. Con frecuencia, la intensidad de la fluorescencia es baja, lo que significa que en prácticamente todos los casos la luz de excitación se filtra con ayuda de un filtro. La débil fluorescencia es entonces, en principio, la única imagen visible. El documento de Patente EP 0 539 888 A (SHIMADZU CORPORATION) de 5 de mayo de 1993 (1993-05-05) describe un dispositivo para la selección automática de células usando propiedades ópticas. El dispositivo de selección está montado en un microscopio óptico y comprende un recipiente transparente móvil para contener las células. Una malla, formada sobre una oblea usando la técnica de patronamiento de semiconductor, está montada en el fondo interior del recipiente como miembro de soporte. Para detectar cada propiedad óptica de las células, un dispositivo captador de imágenes que tiene un sensor de imágenes y un sistema de lente está dispuesto por debajo del recipiente. Se utiliza un dispositivo de enfoque automático para enfocar la imagen de cada una de las células en el dispositivo captador de imágenes midiendo la distancia a cada una de las células y moviendo el sistema de lentes en consecuencia. En el caso de que las células tengan una propiedad óptica de fluorescencia, se obtienen datos de imágenes correspondientes a la intensidad de la fluorescencia recolectando la imagen de cada una de las células bajo el campo oscuro.

25 El documento de Patente US 2005/111090 A1 (KLEINTEICH LOTHAR ET AL) 26 de mayo de 2005 (2005-05-26) discute diversas disposiciones conocidas de excitación de fluorescencia en luz incidente coaxial en estereomicroscopios en relación con un sistema de magnificación.

30 En la práctica, a menudo se realizan estudios de fluorescencia sobre microorganismos. Esto generalmente implica una mayor ampliación, preferiblemente más de 50 veces hasta 100 veces en el objetivo, y alrededor de 1000 X en total para permitir la inspección por medio del ojo humano. Sobre esto, un tamaño típico de un sustrato utilizado es, por ejemplo, un diámetro de 25 mm. Tal tamaño es a menudo necesario, por ejemplo, en el caso de muestras microbiológicas, en las que una cierta cantidad de fluido de muestra debe pasar a través del sustrato para obtener posteriormente las partículas microbiológicas que se van a estudiar posteriormente, concentradas sobre el sustrato. En el proceso, el fluido de muestra pasa a través de perforaciones delgadas en el sustrato, y las partículas permanecen detrás de la superficie del sustrato.

35 Un inconveniente del microscopio de fluorescencia conocido es que el tiempo de medición puede llegar a ser muy largo. En el caso, por ejemplo, de estudios microbiológicos con una potencia de resolución deseada inferior a 1 micrómetro y un sustrato de un diámetro de 25 mm, con un tiempo de medición de unos pocos segundos por imagen, no es excepcional un tiempo de medición total de muchas horas hasta un día, incluso.

40 Un objeto de la presente invención es proporcionar un microscopio de fluorescencia que permita un tiempo de medición mucho más corto mientras se conserva el poder de resolución.

45 Este objeto se logra por medio de un microscopio de fluorescencia y un método para usarlo de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

El microscopio de fluorescencia según realizaciones de la invención comprende un sustrato que comprende una membrana de filtro basada en oblea hecha de un material adecuado para técnicas de procesamiento litográfico, en el que la membrana de filtro comprende un patrón de perforaciones continuas introducidas litográficamente.

50

- 5 En particular, la membrana de filtro se fabrica con la ayuda de una oblea. El hecho es que tales obleas pueden hacerse particularmente planas, de modo que las membranas de filtro que adoptan la forma superficial de la oblea pueden asimismo ser extraordinariamente planas, en particular tan planas que se puede representar sustancialmente toda la superficie del sustrato con enfoque nítido para una disposición de un microscopio de fluorescencia en el que se proporciona una potencia de resolución de 1 micrómetro o menos, por ejemplo 0.5 μm . Esto implica que el sustrato, sobre un diámetro de por ejemplo 3 mm, debe ser plano en 0.5 μm .
- 10 La litografía, por una parte, proporciona técnicas para proporcionar tal sustrato plano y, por otra parte, hace posible introducir muchas perforaciones bien definidas en el sustrato. Es posible que la porosidad sea del 5-20%, incluso del 40%, con un tamaño de perforación de, por ejemplo, 0.1-1 μm . Como resultado, el sustrato se puede hacer ventajosamente mucho más pequeño, como se explicará con más detalle a continuación. Además, los filtrados que implican sustratos de este tipo (tamaño de perforación inferior a 0.19 μm) serán estériles.
- 15 Las membranas de filtro de este tipo, hechas de silicio, son proporcionadas por fluXXion. Las membranas de filtro de silicio de fluXXion tienen una ventaja adicional de ser muy delgadas y, debido al gran número de perforaciones, que además están muy bien definidas, tienen una transmitancia muy alta. Como resultado, pueden proporcionarse sustratos que tienen dimensiones significativamente menores que los sustratos habitualmente utilizados hasta ahora, a la vez que todavía tienen la misma transmitancia total. Es posible, por ejemplo, sustituir un sustrato de la técnica anterior que tiene un diámetro de 25 mm por una membrana de filtro de silicio que tiene un diámetro, en particular, inferior a 10 mm y, por ejemplo, 3 mm. Esto significa que los materiales que se van a estudiar, situados en un fluido de muestra, están a una concentración mucho mayor, habiendo pasado a través de la membrana de filtro, que para los sustratos de la técnica anterior. En la práctica esto también implica que se debe estudiar un área mucho más pequeña. Por ejemplo, una reducción en el área por estudiar desde un diámetro de 25 mm a 3 mm cuadrados significa que se ahorra tiempo por aproximadamente un factor de 50.
- 20
- 25 En este caso, el sustrato, es decir la membrana de filtro, no necesita estar hecho de silicio, pero puede ser fabricado, como se mencionó anteriormente, a partir de un material adecuado para técnicas litográficas. En particular, el sustrato consiste sustancialmente en silicio, un compuesto de silicio, zafiro, un vidrio de silicato o una combinación de los mismos. Tales materiales tienen una idoneidad probada para estas técnicas, buenas propiedades mecánicas, buena resistencia química y baja fluorescencia inherente. Materiales de combinación concebibles incluyen, por ejemplo, los llamados SoS, silicio sobre zafiro.
- 30 Más particularmente, el sustrato comprende sustancialmente silicio. Este elemento es eminentemente adecuado para el procesamiento litográfico, y las técnicas relevantes han sido desarrolladas óptimamente.
- En particular, una superficie del sustrato puede ser dopada con uno o más elementos, con el fin de mejorar así una o más propiedades, especialmente dureza o resistencia química. Ventajosamente, el sustrato tiene una superficie nitrurada o carburada. La nitruración o carburación del sustrato de silicio produce localmente una capa muy dura y duradera de nitruro de silicio o carburo de silicio, respectivamente, mejorando así las propiedades mecánicas.
- 35
- En una realización ventajosa, el sustrato comprende sustancialmente carburo de silicio o dióxido de silicio. En lugar de que la superficie esté carburada, todo el sustrato también puede fabricarse sustancialmente a partir de carburo de silicio, siendo una alternativa el cuarzo (dióxido de silicio).
- 40 Otro problema que a menudo se produce en la microscopía de fluorescencia de la técnica anterior es que el sustrato puede fluorescer. Esto significa que en las mediciones de fluorescencia está presente una señal de fondo o ruido. Esta señal de fondo puede interferir con las mediciones genuinas, es decir, de los materiales por estudiar. Por lo tanto, es deseable proporcionar un sustrato que no fluoresca o sólo lo haga a un nivel bajo. Este objeto se consigue mediante el sustrato que comprende sustancialmente los materiales anteriormente mencionados.
- 45 Ventajosamente, la superficie del sustrato se recubre con una capa metálica sobre al menos un lado. Tal medida asegura una fluorescencia inherente aún más baja del sustrato. Esto proporciona ventajas precisamente sobre los sustratos de acuerdo con la invención en los que las perforaciones se producen litográficamente. Al hacerlo así, se utilizan a menudo productos químicos, cuyos residuos podrían causar fluorescencia. Estos residuos, junto con el sustrato "genuino", son enmascarados ahora por una delgada capa de metal. Un ejemplo de tal capa de metal es una capa de cromo depositada por vapor, aunque también son posibles otros metales.
- 50 Otro punto importante se refiere al enfoque fino en el sustrato. Después de todo, incluso si se utiliza un sustrato perfectamente plano, puede ser necesario que cada sección recién estudiada del sustrato a su vez se ponga en enfoque fino, ya que el sustrato no necesariamente está situado en el plano de enfoque fino del microscopio. De hecho, la altura con respecto al plano de enfoque fino puede determinarse para cada posición. Para un sustrato perfectamente o al menos suficientemente plano, es suficiente, sin embargo, llevar a cabo una medición de 3 puntos

del punto de enfoque fino, determinando de este modo la posición del sustrato con respecto al plano de enfoque fino del microscopio. El sustrato puede inclinarse entonces de manera que esté situado en el plano de enfoque fino del microscopio. Una opción alternativa es entonces un cálculo simple para cada posición de la corrección de enfoque fino deseada que entonces, si se requiere, se puede realizar automáticamente. A medida que se mueve el sustrato, se puede controlar automáticamente un enfoque fino. En esta realización, también, el sustrato plano ahorrará mucho tiempo de enfoque.

En una realización atractiva, el microscopio de fluorescencia comprende un sistema de iluminación de enfoque que tiene una fuente de luz de enfoque que está diseñada para emitir luz de enfoque, en la que una trayectoria óptica de la luz de enfoque y una trayectoria óptica de la luz fluorescente pasa coaxialmente a través del lente objetivo hacia el sustrato. Por lo tanto, esto implica, durante el uso del microscopio de fluorescencia, que la luz ilumine sobre el sustrato durante la operación de enfoque. La sección de la trayectoria óptica para la luz de enfoque desde el sustrato al detector es la misma que la de la luz fluorescente. En otras palabras, es posible producir una imagen del sustrato tanto con luz de enfoque como con luz fluorescente. Esto proporciona la opción de correlacionar la imagen fluorescente con una imagen óptica ordinaria del sustrato, junto con una muestra o espécimen. Esto puede ser beneficioso para la interpretación de las imágenes fluorescentes y, por ejemplo, para limpiarlas de artefactos.

En una disposición de este tipo, la luz de enfoque puede, en principio, comprender luz visible ordinaria. Si es necesario, la luz de enfoque comprende sólo una parte del espectro visible. Ventajosamente, la luz de enfoque comprende sustancialmente luz en una región de longitud de onda fuera de la luz de excitación que, después de todo, será reflejada por el espejo o similar que dirige la luz de excitación sobre el sustrato. Por ejemplo, la luz de enfoque comprende sustancialmente luz que tiene una longitud de onda alrededor o igual a la de la luz fluorescente o incluso sustancialmente luz fluorescente.

El microscopio de fluorescencia comprende además preferiblemente un espejo que transmite parcialmente la luz de enfoque y está situado de tal manera en un trayecto óptico de la luz de enfoque que la luz procedente del sustrato está dirigida hacia el detector de luz. Esto genera la opción de proporcionar la luz de enfoque a través de la lente objetivo. En otras palabras, la luz de enfoque se irradia sobre el sustrato a través de la misma óptica que la empleada para recolectar la luz de enfoque reflejada utilizada para formar una imagen de enfoque. Aquí es importante que el sustrato sea completamente plano, y preferiblemente especular, tal como, por ejemplo, una membrana de filtro de oblea de silicio. Esto tiene la ventaja, entre otras cosas, de que mientras se observa el espécimen o muestra, sólo la sección que se está viendo en ese instante es irradiada con luz de enfoque. Esto es beneficioso dado el blanqueo a menudo rápido inducido por luz o descomposición, causada de manera similar, del espécimen o muestra de la sustancia fluorescente. Otra ventaja es que la luz de enfoque se suministra en el lado idéntico al lado desde el que se emite la luz fluorescente. Tal como sucede, un sustrato transparente es otra opción. Esto, sin embargo, no es muy eficaz con la membrana filtrante de oblea ya que esta, a través de las perforaciones continuas, de hecho forma un elemento óptico que tiene una apertura numérica muy pequeña y por lo tanto una profundidad de enfoque muy grande. Esto a su vez significa que el enfoque fino desde abajo en la luz de enfoque se vuelve difícil, "agudo" en relación con el enfoque del espécimen o muestra con respecto a la óptica de formación de imágenes y la cámara. Después de todo, estas ópticas tienen una apertura numérica mucho menor que la apertura numérica efectiva de las perforaciones continuas en la membrana filtrante.

Debe observarse, sin embargo, que la luz de enfoque también puede suministrarse a través de algún otro trayecto óptico, por ejemplo, incidente oblicuamente sobre el sustrato, por ejemplo por medio de una fuente de luz de enfoque que suministra luz de enfoque alrededor de la lente objetivo. En esta realización también, la presente invención proporciona ventajas, ya que la distancia de trabajo es generalmente mayor, para los ajustes ópticos elegidos, que en los microscopios de fluorescencia de la técnica anterior, y ciertamente mayor que en los microscopios ópticos de inmersión. Estos puntos se explicarán a continuación con más detalle.

Cuando se utiliza una cámara que emplea píxeles como detector sensible a la posición, la llamada resolución en píxeles es preferiblemente al menos tan buena como la resolución óptica del microscopio de fluorescencia, con el fin de retener la mayor cantidad de información posible de la imagen óptica detectada por medio de la cámara. La resolución de píxeles es simplemente el tamaño de píxel dividido por la escala de aumento y está preferiblemente entre 1/3 y 1 X de la resolución óptica, es decir, la resolución de píxeles es preferiblemente al menos tan buena como la resolución óptica (retención de información) pero preferiblemente a lo sumo 3 X mejor, es decir 1/3 X la resolución óptica. Después de todo, una resolución de píxeles "mejor" produciría la apariencia de una resolución efectiva más alta, ya que esa información no estaba realmente presente en la imagen óptica proporcionada.

Si se elige una resolución óptica modesta, es decir, no mayor de lo necesario, particularmente sobre la base de las características de la cámara y no de las del ojo humano, puede ser suficiente un aumento menor. Esto lleva la ventaja principal de que puede mantenerse el número de píxeles requerido o por lo menos que la relación entre el campo de imagen medido y el número de píxeles es favorable. Ese número de píxeles determina no sólo el precio y la complejidad de la cámara, sino también, sobre todo, la velocidad de lectura. Alternativamente, es posible usar sólo un número limitado de píxeles de un CCD presente para grabar la imagen, no más píxeles de los necesarios para lograr la resolución deseada. En ambos casos, un número pequeño de píxeles significa una alta velocidad de lectura y por

lo tanto una medición más rápida.

5 Para dar un ejemplo, una resolución deseada es $0.5 \mu\text{m}$, y se usa luz verde que tiene una longitud de onda de 530 nm . La apertura numérica correspondiente es entonces de al menos 0.40 . Para tamaños de píxeles de $5 \mu\text{m}$ y una resolución de píxeles deseada de $0.5 \times$, la resolución óptica, es decir $0.25 \mu\text{m}$, da como resultado un factor de aumento requerido para la cámara de $20 \times$ en total. Una opción viable en la práctica es entonces elegir, por ejemplo, una lente objetivo de $f = 10 \text{ mm}$ y una lente de formación de imágenes de $f = 200 \text{ mm}$. Se trata de longitudes focales que permiten la construcción compacta del microscopio a la vez que se sigue permitiendo una distancia de trabajo de alrededor de 2 cm . Obviamente, son posibles otras resoluciones deseadas, al igual que otras longitudes de onda fluorescentes, tamaño de píxel, relaciones entre la resolución de píxeles y resolución óptica, preferiblemente entre $1:1$ y $1:3$ y longitudes focales de lente objetivo y lente de formación de imágenes, sistemas de lente compuestos.

10 De la manera anteriormente mencionada es posible asegurar que el factor de fuerza o de aumento de la lente objetivo puede mantenerse bajo, mientras que la ampliación total es todavía suficiente, en combinación con los tamaños de píxeles pequeños, para conseguir la potencia de resolución deseada. Una ventaja adicional es que la apertura numérica (NA) de la lente objetivo no necesita mantenerse particularmente grande, lo que significa que no es necesaria la inmersión a grandes aumentos.

15 De hecho, se produce una estimación de la NA requerida para el microscopio sobre la base de la resolución deseada cuando se utiliza una cámara en lugar del ojo humano y se determina a continuación el factor de aumento requerido sobre la base del tamaño de píxel y resolución de píxeles deseada.

20 Una ventaja importante de lentes que tienen una NA relativamente pequeña, ventajosamente 0.45 y menos, es que la profundidad de enfoque es relativamente grande. Esto a su vez significa que no se requiere una nueva focalización aguda del sustrato o al menos se requiere menos frecuentemente y que incluso un sustrato relativamente más grueso puede medirse todavía en su totalidad sin ajuste del microscopio.

25 Esto ofrece ventajas, particularmente en combinación con la membrana de filtro de oblea muy plana, puesto que ahora es posible una medición completa del sustrato con una única operación de enfoque fino. De hecho, la membrana filtrante de oblea forma un sustrato bidimensional, que permite enfocar con nitidez los orificios de la membrana en la superficie de la misma, mientras que al mismo tiempo el espécimen o muestra se coloca directamente sobre esa superficie.

30 La inmersión en, por ejemplo, agua o aceite implica siempre la evaporación del respectivo fluido de inmersión, lo que a menudo es indeseable. Además, es posible, y este es un inconveniente más significativo, que se produzca contaminación en forma de contaminación cruzada con diferentes muestras. Esto puede ocurrir no simplemente como resultado de la evaporación del fluido de inmersión, por ejemplo arrastrando microorganismos u otro material, sino también como resultado de que dicho material se transfiere a través del fluido de inmersión de una muestra a otra. Dado el pequeño factor de aumento de la lente objetivo, la presente invención proporciona una manera sencilla de establecer una gran distancia de trabajo y, de este modo, evitar la contaminación.

35 Ventajosamente, el espejo de transmisión parcial comprende un espejo o un así denominado divisor de haces con patrón de lunares, siendo la relación entre el coeficiente de reflexión y el coeficiente de transmisión para la luz de enfoque de al menos 10 y ventajosamente de al menos 100 . Preferiblemente, la relación entre el coeficiente de reflexión y el coeficiente de transmisión para la luz fluorescente es al menos 100 . En el caso de la inyección coaxial de la luz de enfoque, está presente un elemento óptico que transmite parcialmente la luz de enfoque y luego la refleja parcialmente hacia el detector o viceversa si las posiciones del detector y la fuente de luz de enfoque se intercambian.

40 La invención se refiere además a un método para detectar fluorescencia de una muestra sobre un sustrato, utilizando un microscopio de fluorescencia de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones adjuntas 1 a 11 , que comprende la irradiación del espécimen sobre el sustrato con luz de excitación y detectar la luz fluorescente de la muestra. Utilizando el microscopio de fluorescencia según la invención, en particular el sustrato de oblea de silicio, es posible conseguir ahorros de tiempo notables en las mediciones de fluorescencia. Además, no hay virtualmente ninguna fluorescencia causada por el sustrato.

45 En particular, la fuente de luz de enfoque emite sustancialmente luz de enfoque sólo cuando la muestra es enfocada. Como resultado, hay menos blanqueo del espécimen o muestra sobre el sustrato. En virtud de que la iluminación con luz de enfoque es preferiblemente coaxial con la radiación de excitación, es posible alternar entre imágenes de luz de enfoque, que producen una imagen de luz visible si se requiere, e imágenes fluorescentes, siendo fácilmente posible una correlación entre ellas. En el caso de que el sustrato sea reubicado, si se requiere un nuevo enfoque fino, una fuente de luz de enfoque puede simplemente conectarse durante un corto tiempo de enfoque.

Además, la fuente de luz de enfoque emite muy poca luz, o al menos muy poca luz alcanza el espécimen o muestra. La luz de enfoque, en principio, está restringida a un nivel necesario para permitir un enfoque fino, permitiendo así

minimizar el blanqueo y otros efectos desventajosos sobre el espécimen o muestra. Obviamente, dicho nivel de luz puede ser mayor si la muestra no sufre como resultado, permitiendo así que el enfoque fino sea más rápido y/o más preciso.

5 En una realización específica, la fluorescencia se detecta a partir de cada una de varias subáreas de la muestra sobre el sustrato, se determina entonces la información relevante de la imagen a partir de la fluorescencia detectada en una subárea, seleccionándose aleatoriamente las subáreas de la muestra y donde la medición de la fluorescencia se interrumpe si la información de imagen relevante de todas las subáreas medidas hasta entonces en suma excede un umbral de nivel de confianza predeterminado. De este modo, el tiempo de medición puede reducirse aún más. Deberá entonces elegirse previamente un umbral que indicará en qué punto se habrá medido un espécimen o muestra particular a un nivel de confianza suficiente. Un ejemplo sencillo es el de requerir la determinación de la presencia de un microorganismo particular. Allí, después de todo, es suficiente detectar uno o varios individuos de ese microorganismo. Evidentemente, también es posible elegir un valor estándar (legal) como valor umbral, siendo suficiente para establecer si se ha superado dicha norma, etc. La incorporación de la detección de umbral que se supera de esta manera puede efectuarse, por ejemplo, y preferiblemente, por medio de un equipo automatizado de reconocimiento de patrones. También se describe un sustrato para su uso en un microscopio de fluorescencia de acuerdo con la invención, que comprende una membrana de filtro basada en oblea hecha de un material adecuado para técnicas de procesamiento litográfico, donde la membrana de filtro comprende un patrón de perforaciones continuas introducidas litográficamente, siendo recubierto el sustrato con una capa metálica sobre al menos un lado. Debido a la capa de metal, la fluorescencia residual inherente del material del sustrato puede suprimirse eficientemente. En lo que respecta a los materiales de base del sustrato y los tipos de metal en la capa de metal, se puede hacer uso de los materiales ya descritos anteriormente. Además, se describe un método para fabricar el sustrato, que comprende las etapas de proporcionar una membrana de filtro basada en oblea, proporcionar la membrana de filtro con perforaciones por medio de una técnica litográfica y luego revestir al menos un lado de la membrana de filtro con una capa de metal. Como se ha descrito anteriormente, las perforaciones pueden tener, por ejemplo, un diámetro entre 0.1 y 1 μm , aunque no se excluyen otros diámetros o formas. Debe observarse que también es posible que la capa de metal se deposite primero en fase de vapor y que después se introduzcan las perforaciones, lo que tiene la ventaja de que el interior de las perforaciones está libre de metal. En ese caso, sin embargo, el metal podría interferir con los pasos litográficos, y sería además posible que quedaran detrás productos químicos litográficos residuales, lo que conlleva el riesgo de fluorescencia residual.

30 El microscopio de fluorescencia y el método de detección de fluorescencia de una muestra sobre un sustrato de acuerdo con la invención proporcionan entre otras cosas una ganancia en la velocidad de las mediciones de fluorescencia. Dicha ganancia en velocidad resulta, entre otras cosas, del uso de la membrana filtrante de la oblea, lo que conduce a una ganancia de velocidad en virtud de proporcionar, en comparación con sustratos conocidos, un filtro igualmente eficaz sobre una superficie mucho menor que, por lo tanto, puede ser probado más rápidamente. Además, es un filtro plano que no requiere un enfoque fino una y otra vez. Una medición de tres puntos es suficiente, pudiéndose realizar automáticamente cualquier control subsiguiente. Además, se utiliza una cámara que proporciona un poder de resolución mejor que el ojo humano, permitiendo así una apertura numérica más pequeña de las lentes utilizadas. Esto significa lentes menos caras, y en muchos casos la inmersión ya no es necesaria. Además, un factor de ampliación más pequeño es suficiente, al menos si los píxeles de la cámara no son demasiado grandes en términos de la potencia de resolución óptica deseada, permitiendo así que se utilicen distancias focales más largas, dando como resultado una mayor distancia de trabajo. Esto a su vez tiene ventajas en la prevención de la contaminación por inmersión. Además, es beneficioso dejar de medir una vez que las estadísticas observadas dan motivo para hacerlo. En conjunto, el microscopio de fluorescencia, el método y el sustrato se pueden utilizar para medir la fluorescencia de forma muy rápida, fiable y sin contacto.

45 La invención se explicará a continuación con referencia al dibujo, cuya única figura es una representación esquemática de una sección transversal de un microscopio de fluorescencia de acuerdo con la invención.

La figura 1 muestra un microscopio de fluorescencia de acuerdo con la invención en sección transversal.

50 El microscopio de fluorescencia se designa generalmente con el número de referencia 1 y comprende una carcasa 10 con una cámara 12 montada sobre el mismo. En la carcasa 10 está prevista una fuente 14 de luz de excitación, junto con una primera lente 16, un filtro 18 de excitación y un espejo 20 dicróico.

En la figura 1, en la parte inferior de la carcasa 10 está prevista la lente 22 objetivo, a través de la cual se puede iluminar un sustrato 24. El sustrato 24 se aloja en un soporte 26 de sustrato, mientras que 28 indica una platina de traslación de sustrato x-y-z.

55 El número de referencia 30 indica un espejo o divisor de haces de transmisión parcial, 32 un filtro de emisión, y 34 una lente de formación de imágenes.

En la parte superior de la carcasa 10 están indicadas una fuente 36 de luz de enfoque y una lente 38 de enfoque.

La carcasa 10 del microscopio 1 de fluorescencia de acuerdo con la invención es una carcasa sustancialmente hermética a la luz. La carcasa 10 puede estar hecha, en principio, de cualquier material tal como metal y/o plástico. En la carcasa 10 están dispuestos varios componentes ópticos y otros.

5 Una fuente 14 de luz de excitación está dispuesta en la carcasa 10, para proporcionar luz de excitación. La fuente de luz de excitación puede comprender, en principio, cualquier fuente de luz adecuada para este propósito, tal como uno o más LEDs, una lámpara de mercurio (de alta presión), un láser, etc. La longitud de onda de la luz de excitación de la fuente 14 de luz de excitación se selecciona como una función de los materiales fluorescentes a estudiar, pero en general es luz de longitudes de onda relativamente cortas. Las longitudes de onda comúnmente usadas están en el verde hasta e incluyendo la región ultravioleta cercana, pero no se descartan otras longitudes de onda. En este caso, por ejemplo, la fuente 14 de luz de excitación es una fuente de LED azul.

15 La luz emitida por la fuente 14 de luz de excitación pasa a través de una primera lente 16, diseñada para formar un haz de luz de excitación adecuado, por ejemplo de homogeneidad suficientemente alta. El haz de luz también pasa a través de un filtro 18 de excitación que está diseñado para filtrar fracciones de luz no deseadas. En particular, esto se refiere a fracciones de luz procedentes de la luz de excitación que corresponden a la luz fluorescente. Tal fracción en la luz de excitación podría, después de todo, interferir con la medición de fluorescencia subsiguiente. Si es necesario, el filtro 18 de excitación también puede ajustarse para eliminar una porción de mayor o menor magnitud de la luz que no sea la luz de excitación o la luz fluorescente. De este modo se evita, en la medida de lo posible, el ruido resultante de la luz no relevante para la medición de fluorescencia. Los filtros adecuados pueden ser fácilmente seleccionados por los expertos en la técnica, dependiendo de qué tipos de luz de excitación y/o luz fluorescente se están utilizando. Si es necesario, el filtro de excitación puede comprender 2 o más subfiltros.

20 Mientras que en el presente caso la fuente de luz de excitación se muestra dentro de la carcasa 10, también es posible instalar la fuente de luz de excitación fuera de la carcasa 10, estando dispuesto un acoplamiento hermético a la luz, si se requiere, entre la fuente 14 de luz de excitación y la carcasa 10 -véase también el acoplamiento con la cámara 12-, que se describirá a continuación.

25 La luz de excitación así colimada y filtrada se irradia hacia el sustrato 24 a través de un espejo 20 dicróico y a través de la lente 22 objetivo. El espejo 20 dicróico está diseñado, por ejemplo, para reflejar la mayor cantidad de luz de excitación posible, mientras que la luz fluorescente procedente del sustrato 24 pasa a través con alta transmitancia. Todo esto se puede lograr fácilmente, como es conocido por los expertos en la técnica, mediante el apilamiento adecuado de capas dieléctricas.

30 La lente 22 objetivo puede ser, por ejemplo, un objetivo de microscopio estándar, que tiene un factor de aumento, por ejemplo, entre 10 veces y 45 veces. La abertura numérica puede estar, por ejemplo, entre 0.2 y 0.5. La distancia de trabajo puede ser, por ejemplo, de unos pocos milímetros e incluso puede ser de unos pocos centímetros. Debe tenerse en cuenta que esta distancia de trabajo es suficiente para permitir mediciones sin contacto del sustrato 24.

35 El sustrato 24 puede, en principio, ser cualquier sustrato adecuado para este fin, por ejemplo un portaobjetos de vidrio o similar. Para mediciones microbiológicas, en particular, a menudo se usan sustratos que están provistos de muchas pequeñas perforaciones. Antes de la medición, por ejemplo, se hace pasar una muestra que contiene microorganismos o similares a estudiar a través del sustrato, con el material por estudiar que queda detrás, mientras que el fluido puede drenarse a través de las perforaciones en el sustrato. Los sustratos típicos utilizados para estas pruebas comprenden, por ejemplo, sustratos poliméricos. Ventajosamente, sin embargo, el sustrato 24 comprende, por ejemplo, un filtro de membrana de silicio. Los filtros de membrana de silicio de este tipo, por ejemplo comercializados por fluXXion, se fabrican a partir de silicio que no fluoresce o lo hace tan sólo a un nivel muy bajo y como resultado no puede interferir con ninguna medida de fluorescencia. Además, las membranas de filtro de silicio de este tipo se fabrican sobre la base de una oblea de silicio como se utiliza en la tecnología de semiconductores. Por lo tanto, las membranas de filtro de silicio son también muy planas, lo que significa que en una disposición perpendicular al eje óptico del microscopio de fluorescencia es posible conseguir en general una imagen nítida sin ajuste, incluso con gran aumento. Otra ventaja de las membranas de filtro de silicio de este tipo es que la permeabilidad es muy alta, debido al gran número de perforaciones que, además, se definen dentro de límites muy estrechos. Esto significa que la membrana de filtro puede ser altamente selectiva durante la filtración y también significa que las dimensiones del sustrato 24 pueden mantenerse muy bajas y todavía permitir que una cantidad idéntica de fluido de muestra sea filtrada dentro de un período de tiempo habitual en la práctica. Una membrana de filtro de silicio que tiene una sección transversal de, por ejemplo, 3 milímetros, puede ser suficiente para este propósito, siendo posibles obviamente otras dimensiones.

55 El sustrato 24 se aloja en un soporte 26 de sustrato que comprende una platina 28 de traslación de sustrato (mostrada sólo en contorno). La platina 28 de traslación de sustrato se utiliza para trasladar el sustrato 24 en direcciones situadas en el plano de imagen del microscopio 1 de fluorescencia, aquí también denominadas direcciones x y y, y además, con el fin de enfocar finamente, también en la dirección perpendicular a la misma, aquí también denominada dirección z. Además, la platina de traslación de sustrato puede estar diseñada para inclinar el sustrato 24 de tal manera alrededor del eje x y/o eje y que la superficie del sustrato esté situada en el plano de enfoque fino del microscopio 1 de fluorescencia. Esta última característica es ventajosa, puesto que el sustrato de membrana de filtro de silicio altamente

plana es capaz de alinearse en su totalidad en el plano de enfoque fino mediante una medición de tres puntos. Además, el sustrato es tan plano y la profundidad de enfoque tan grande en el microscopio de fluorescencia de acuerdo con la invención que todo el sustrato permanece dentro de la profundidad de enfoque sobre toda la traslación x, y. El valor z se puede establecer simplemente como una función de x e y, por ejemplo una combinación lineal de x e y.

5 La luz de excitación de la fuente 14 de luz de excitación incidente sobre el sustrato 24 que porta los materiales por estudiar, será capaz de dar lugar a fluorescencia. La luz fluorescente generada como resultado, a su vez, a través de la lente 22 objetivo, entrará en la carcasa 10 donde pasará sustancialmente el espejo 20 dicróico. Entonces la luz fluorescente caerá sobre el espejo 30 parcialmente transmisor y se reflejará de este modo hacia la cámara 12. En primer lugar, sin embargo, pasa a través de un filtro 32 de emisión que está diseñado para transmitir sustancialmente sólo luz fluorescente. Para decirlo en términos más generales, el propósito del filtro 32 de emisión es mejorar la relación entre la luz fluorescente y otra luz, en particular la luz de excitación. En principio, podría incluso ser suficiente que el filtro 32 de emisión también bloquee solamente la radiación de excitación en gran medida, pero el filtro 32 de emisión también puede servir para seleccionar un tipo particular de fluorescencia. Después de todo, los materiales distintos de los que deben estudiarse pueden fluorescer, particularmente el sustrato. Si se utiliza una membrana de filtro de silicio como sustrato 24, este tipo de fluorescencia es usualmente despreciable.

10 La luz fluorescente pasa entonces a través de la lente 34 de formación de imágenes, que tiene una longitud de onda, por ejemplo, de 530 nm. La cámara 12 puede ser una cámara CCD o similar, que tiene un tamaño de píxel de 10 micrómetros o menos. En un ejemplo concreto, el tamaño de píxel es de 4.65 μm , por ejemplo, y una relación deseable entre la resolución de píxeles y la resolución óptica es al menos un factor de 2. Para una potencia de resolución óptica requerida de, por ejemplo, aproximadamente 0.5 μm , la resolución de píxeles entonces, por ejemplo, es 0.23 μm , y el factor de aumento requerido es aproximadamente 20. Por ejemplo, la lente 22 objetivo tiene una longitud focal de 10 mm y una NA de 0.42, y la lente 34 de formación de imágenes tiene una longitud focal de 200 mm. Dada dicha combinación, se consigue también una distancia de trabajo beneficiosa, es decir, suficientemente grande en la lente 22 objetivo.

25 Como alternativa a la cámara 12 CCD, también sería posible utilizar, por ejemplo, una cámara CMOS o, por ejemplo, una placa fotográfica. Una cámara CCD o CMOS tiene la ventaja de que las imágenes pueden ser procesadas electrónicamente y, como ya se ha dicho, tienen una mejor resolución óptica efectiva que el ojo humano. Con este fin, la cámara 12 puede, por ejemplo, estar conectada a un ordenador equipado con un equipo de procesamiento de imágenes y/o reconocimiento de imágenes y/o software (no mostrado).

30 Debe observarse que la trayectoria de rayos de la radiación fluorescente mostrada en la figura 1, es decir, a través del espejo 30 parcialmente transmisor hacia la cámara 12, se eligió con respecto a la fuente 36 de luz de enfoque. En ausencia de la fuente 36 de luz de enfoque, la cámara podría también haber sido colocada en la posición de dicha fuente 36 de luz de enfoque, resultando en consecuencia superfluo el espejo 30 de transmisión parcial. El microscopio 1 de fluorescencia ilustrado en la figura 1 incorpora, sin embargo, una fuente 36 de luz de enfoque. Su finalidad es emplear una cantidad suficiente de luz para poder situar, de manera sencilla, el sustrato 24 en el plano de enfoque fino del microscopio 1 de fluorescencia. A este fin, la fuente 36 de luz de enfoque, por ejemplo, emite luz blanca o luz verde, en particular luz que es transmitida por el filtro 32 de emisión y obviamente el espejo 20 dicróico. El color de la luz por emitir por la fuente 36 de luz de enfoque depende por lo tanto del color de la luz procedente de la fuente 14 de luz de excitación y del color de la luz fluorescente. Todos estos aspectos pueden ser elegidos fácilmente por los expertos en la técnica. La fuente 36 de luz de enfoque puede, a su vez, por ejemplo, ser una fuente de LED o, alternativamente, una lámpara incandescente (halógena) o una lámpara de vapor de mercurio (de alta presión). También son posibles otras fuentes de luz. Ventajosamente, se utiliza una fuente de LED, cuyos beneficios incluyen la opción de conmutación rápida, evitando así la necesidad de un obturador mecánico, espejo rotatorio o similar, así como una larga vida útil y una iluminación eficaz debido a una alta eficiencia intrínseca y un ancho de banda relativamente estrecho, lo que significa que los filtros y sustrato necesitan trabajar con potencia relativamente baja. Estas ventajas, por cierto, se aplican igualmente en el caso en que la fuente de excitación comprenda una fuente de LED.

50 El objetivo de la lente 38 de enfoque es obtener un haz de luz lo suficientemente homogéneo, que sea conducente a un enfoque fino. Otro beneficio es que durante el proceso de enfoque, también denominado alineación, el sustrato 24, los materiales posiblemente presentes por estudiar, en particular bacterias marcadas, no se blanquearán. Esto tendría un efecto adverso sobre las mediciones de fluorescencia que se realizarán posteriormente. Para evitar el blanqueo, la fuente 36 de luz de enfoque se utiliza únicamente durante el enfoque. También es beneficioso seleccionar una alta relación entre las intensidades de luz de la luz de excitación y la luz de la fuente 36 de luz de enfoque cuando alcanzan el sustrato 24. Utilizando las fuentes de LED descritas anteriormente para la fuente 14 de luz de excitación y la fuente 36 de luz de enfoque, por ejemplo, se puede conseguir fácilmente una relación entre la luz de excitación y la luz de alineación de 2000:1. Entre el espejo 30 parcialmente transmisor y la lente 38 de enfoque, puede colocarse opcionalmente un segundo filtro de emisión que puede corresponder sustancialmente al filtro 32 de emisión. En tal caso, puede alcanzarse fácilmente una relación de 10.000:1. Dadas tales relaciones, cualquier blanqueo, por la luz de enfoque, de los materiales por estudiar puede ser evitado de manera fiable. El uso de sustratos planos y pequeños tiene la ventaja adicional de que el enfoque fino sólo se debe llevar a cabo un número pequeño de veces.

Un comentario general con respecto al uso del término "lente" es que en todos los casos esta lente puede ser también una lente compuesta, es decir, que comprende una pluralidad de elementos ópticos. Además, en principio, se pueden invertir las posiciones del filtro 32 de emisión y del filtro 18 de excitación con respecto a las lentes asociadas, la lente 34 de formación de imágenes y la lente 16 de iluminación.

- 5 Las realizaciones descritas deben considerarse como ejemplos no limitativos. El alcance de la protección de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Microscopio (1) de fluorescencia que comprende una carcasa (10) con una fuente (14) de luz de excitación diseñada para emitir luz de excitación, un medio (18) de filtración que separa la luz de excitación de la luz fluorescente generada por una sustancia fluorescente, una lente (22) objetivo, un soporte (26) de sustrato, un detector de luz sensible a la posición y una lente de formación de imágenes para el detector de luz sensible a la posición, comprendiendo además el microscopio un sistema de iluminación de enfoque que tiene una fuente (36) de luz de enfoque que está diseñada para emitir luz de enfoque, comprendiendo además el microscopio un sustrato(24) sustancialmente plano que comprende una membrana de filtro basada en oblea hecha de un material adecuado para técnicas de procesamiento litográfico, en el que la membrana de filtro comprende un patrón de perforaciones continuas introducidas litográficamente, en el que una trayectoria óptica de la luz de enfoque y una trayectoria óptica de la luz fluorescente se desplazan coaxialmente a través de la lente (22) objetivo hacia el sustrato (24), y en el que el sistema de iluminación de enfoque está configurado para determinar una posición del sustrato con respecto a un plano de enfoque fino midiendo una distancia de enfoque de tres puntos no colineales del sustrato.
- 10 2. Microscopio (1) de fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustrato (24) consiste sustancialmente en silicio, un compuesto de silicio, zafiro, un vidrio de silicato o una combinación de los mismos.
- 15 3. Microscopio (1) de fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el sustrato (24) comprende sustancialmente silicio o carburo de silicio o dióxido de silicón.
4. Microscopio (1) de fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el sustrato (24) tiene una superficie nitrurada o carburada.
- 20 5. Microscopio (1) de fluorescencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la superficie del sustrato (24) está recubierta con una capa metálica sobre al menos un lado.
- 25 6. Microscopio (1) de fluorescencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el soporte (26) de sustrato comprende una platina (28) de traslación de sustrato para trasladar el sustrato (24) en un plano de imagen del microscopio (1) de fluorescencia y en el que la platina (28) de traslación de sustrato está configurada para inclinar el sustrato (24), alineando de este modo el sustrato (24) con el plano de enfoque fino.
7. Microscopio (1) de fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además un espejo que transmite parcialmente la luz de enfoque y está situado de tal manera en una trayectoria óptica de la luz de enfoque que la luz procedente del sustrato (24) es dirigida hacia el detector de luz.
- 30 8. Microscopio (1) de fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, que comprende además un filtro que está situado entre el espejo de transmisión parcial y la fuente de luz de enfoque y que tiene una transmitancia más baja para la luz de excitación que para la radiación fluorescente.
9. Microscopio (1) de fluorescencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tamaño de la perforación es menor que 0.19 micrómetros.
- 35 10. Microscopio (1) de fluorescencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que una porosidad está en el intervalo de 5-40%.
11. Microscopio (1) de fluorescencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustrato (24) tiene un diámetro de menos de 10 mm, preferiblemente 3 mm.
12. Método de detección de fluorescencia de una muestra sobre un sustrato, utilizando un microscopio de fluorescencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:
- 40 - la irradiación de la muestra sobre el sustrato con luz de excitación,
- detección de luz fluorescente de la muestra.
13. Método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la fuente de luz de enfoque emite sustancialmente luz de enfoque sólo cuando la muestra es enfocada.
- 45 14. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en el que la fluorescencia se detecta a partir de cada una de varias subáreas de la muestra sobre el sustrato, se determina entonces la información de imágenes relevante a partir de la fluorescencia detectada en una subárea, siendo las subáreas aleatoriamente elegidas de la muestra y donde se interrumpe la medición de la fluorescencia si la información de imagen relevante de todas las

subáreas medidas hasta entonces en suma excede un umbral de nivel de confianza predeterminado.

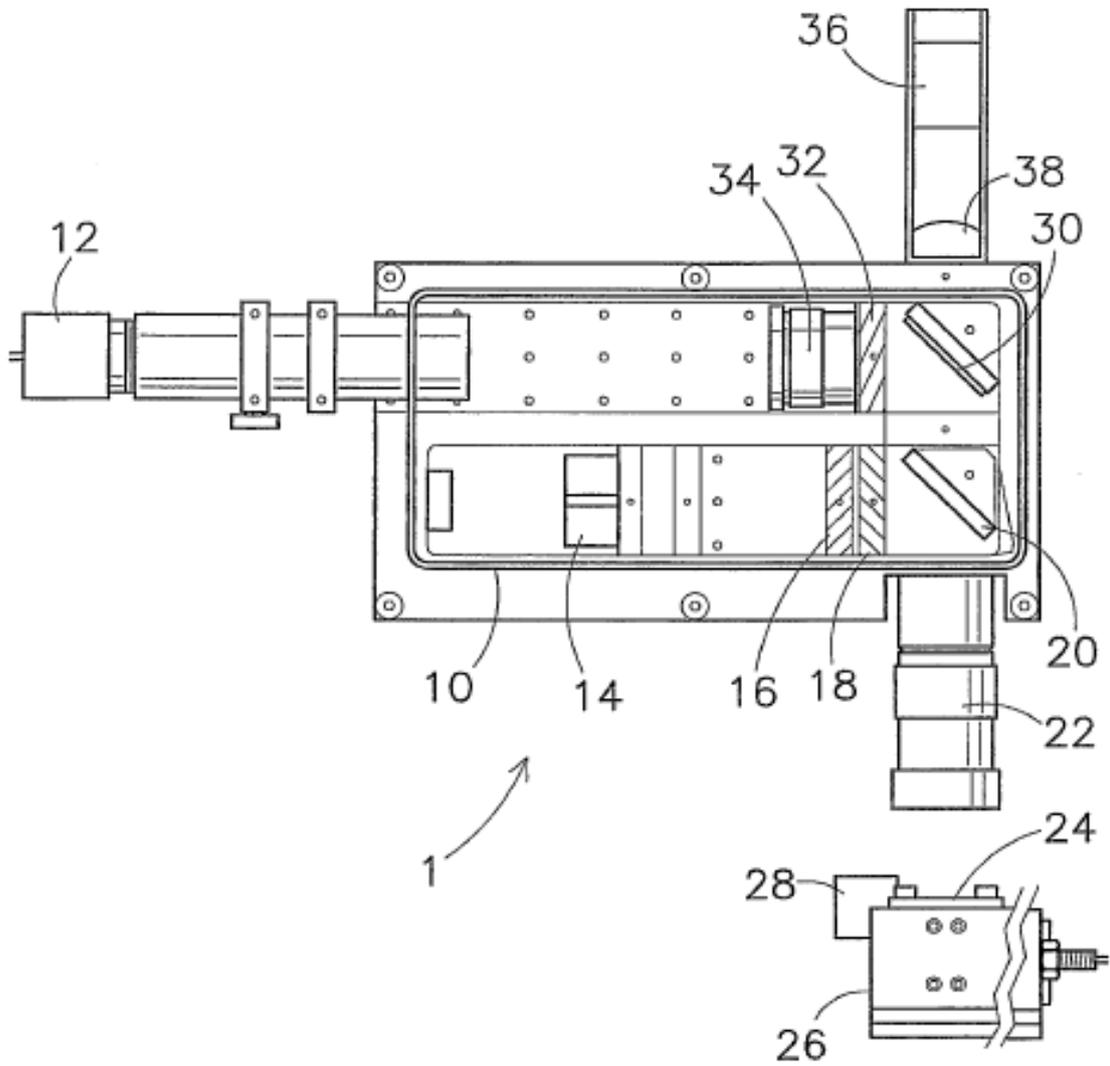


Fig 1