

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 069**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2008 PCT/US2008/010402**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2009 WO09032297**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2008 E 08829889 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2188615**

54 Título: **Dispositivo para medir concentraciones de constituyentes en muestras de lágrimas**

30 Prioridad:

06.09.2007 US 899596

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

23.05.2018

73 Titular/es:

**LACRISCIENCES LLC (100.0%)
4910 Massachusetts Ave., Suite 21
Washington DC 20016, US**

72 Inventor/es:

**CAPPO, ANTHONY, P.;
BENNETT, GREGORY;
GILBARD, JEFFREY, P.;
GAVARIS, PAUL, T. y
SARKAR, DIPTABHAS**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 669 069 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para medir concentraciones de constituyentes en muestras de lágrimas

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un aparato y a un método para medir constituyentes seleccionados de lágrimas. El aparato resulta útil para el diagnóstico de diversas enfermedades oculares.

10 Estado de la técnica

El síndrome de ojo seco o queratoconjuntivitis seca (KCS) es uno de los diagnósticos más frecuentes en oftalmología. Las estimaciones actuales afirman que aproximadamente 40-60 millones de personas en los Estados Unidos presentan síntomas de ojo seco. La falta de datos estadísticos precisos sobre la aparición del ojo seco se debe en gran parte a la falta de equipos de diagnóstico de última generación. Sin embargo, una tendencia más preocupante es el diagnóstico erróneo del ojo seco o la incapacidad de una detección temprana, ya que no siempre se identifica fácilmente a los pacientes sintomáticos.

La búsqueda de un diagnóstico más eficaz fortalecerá el paradigma de la atención oftálmica disponible en dicho país. La industria farmacéutica es consciente de esta situación. Están apareciendo en el mercado los primeros medicamentos recetados para el tratamiento del ojo seco, previéndose lanzamientos adicionales en los próximos veinticuatro meses y, sin embargo, los métodos para el diagnóstico y el seguimiento del tratamiento siguen resultando problemáticos.

No existe una prueba "de referencia" que diagnostique el ojo seco y controle el efecto de su tratamiento. El método popular consiste en una matriz de observación subjetiva de síntomas y pruebas objetivas (tales como las pruebas de Schirmer, las técnicas de tinción y el tiempo de desintegración de la película lagrimal), ninguno de los cuales es específico para detectar el ojo seco o medir su gravedad.

Teniendo en cuenta los recientes avances farmacéuticos destinados a tratar el ojo seco, se necesitan avances oportunos y paralelos en las tecnologías de diagnóstico.

La osmolaridad de una lágrima -el grado de sólidos disueltos en la misma- está aceptada popularmente por los expertos en el campo como un indicador de la presencia y severidad del ojo seco. El instrumento más comúnmente asociado con la medición de la osmolaridad de las lágrimas es el osmómetro; sin embargo, las limitaciones técnicas han restringido el uso de osmómetros lagrimales principalmente a los entornos de investigación.

Un osmómetro es un dispositivo que mide la concentración de solutos disueltos en agua. Aunque se usan ampliamente en otros campos, los osmómetros se usan en aplicaciones médicas tales como la determinación de la brecha osmol en casos de toxicología y trauma, la monitorización de infusiones de tratamiento con manitol, el control de la absorción en ingesta de glicina con fluidos de irrigación en procedimientos quirúrgicos, entre otras.

A pesar de la idoneidad de esta tecnología para medir la osmolaridad de la lágrima, los dispositivos actuales presentan ciertas limitaciones que impiden su uso generalizado en un entorno clínico. El problema más frecuente tiene que ver con el tamaño de las muestras.

Casi todos los osmómetros comercialmente disponibles están diseñados (y tal vez tecnológicamente limitados) para medir muestras de tamaño milimétrico. Las muestras de lágrima extraídas de pacientes tienden a presentar volúmenes en nanolitros y, para complicar aún más las cosas, los pacientes con ojo seco generalmente producen menos lágrimas y esto dificulta el manejo de las muestras. El único osmómetro diseñado para medir muestras con tamaños en nanolitros ya no está disponible comercialmente, y resulta demasiado engorroso para su uso práctico en un entorno clínico. El resultado es que a los oftalmólogos en activo les queda una metodología caótica y herramientas inadecuadas para detectar con precisión esta dolencia prevalente.

55 Síndrome del Ojo Seco

El síndrome del ojo seco es un complejo grupo de enfermedades, que se caracteriza por una disminución en la producción de uno o más de los tres componentes de la película lagrimal: la capa lipídica, la capa acuosa y la capa de mucina. Una deficiencia en uno de los componentes de la película lagrimal puede conllevar la pérdida de la estabilidad de la película lagrimal. La vista normal depende de una superficie ocular húmeda y requiere una calidad suficiente de las lágrimas, una composición normal de la película lagrimal, el parpadeo regular y el cierre normal de los párpados como requisitos previos. Si no se trata, el síndrome del ojo seco puede causar cambios patológicos progresivos en el epitelio conjuntival y corneal, malestar, ulceración corneal e incluso derivar en ceguera.

El tratamiento estándar ha sido la terapia de reemplazo lagrimal, que intenta imitar la película lagrimal humana o presentar una versión hipoosmolar más sofisticada de la película lagrimal. Desafortunadamente, a medida que el

síndrome del ojo seco progresa más allá de su etapa leve, esta terapia común resulta menos efectiva. Adicionalmente, estos tratamientos no abordan la etiología del ojo seco.

5 En la actualidad se desconocen los mecanismos precisos que dan lugar al ojo seco, y han sido objeto de muchos debates a lo largo de los años. En los últimos años se han propuesto varios mecanismos diferentes como posible etiología del ojo seco, siendo la ideología general que el ojo seco generalmente está causado por un problema con la calidad de la película lagrimal que lubrica la superficie ocular. Ciertas investigaciones más recientes han propuesto que el ojo seco puede ser el resultado de una disminución del estado hormonal ante el envejecimiento (siendo más prominente en mujeres posmenopáusicas), o de una base inmune y una dolencia inflamatoria adquirida
10 en la superficie ocular. Otras causas de los síntomas del ojo seco pueden producirse debido a ciertos medicamentos (es decir, antihistamínicos, betabloqueantes), asociaciones con ciertas enfermedades inflamatorias sistémicas (es decir, artritis reumatoide), causas mecánicas (es decir, cierre incompleto de los párpados), causas infecciosas (es decir, infecciones virales) y ciertas causas neurológicas (es decir, procedimientos LASIK). A pesar de los avances recientes en el conocimiento de los posibles factores patogénicos del ojo seco, ha habido una falta de consenso en cuanto a los criterios diagnósticos apropiados, los objetivos específicos de las pruebas diagnósticas objetivas, el papel del síntoma subjetivo en el diagnóstico y la interpretación de los resultados.

15 Los síntomas del ojo seco varían considerablemente de un individuo a otro. La mayoría de los pacientes se quejan de que tienen la sensación de cuerpos extraños, ardor y malestar general de los ojos. Habitualmente describen la incomodidad como una sensación áspera, seca, dolorosa, arenosa, punzante o ardorosa. La incomodidad es el sello distintivo del ojo seco dado que la córnea está provista de abundantes fibras nerviosas sensoriales.

20 A pesar de su elevada prevalencia, el ojo seco no siempre resulta fácil de diagnosticar. La gran mayoría de los pacientes presentan síntomas cuya intensidad va de leve a moderada. Aunque estos pacientes realmente sufren molestias, pueden pasarse por alto los signos objetivos del ojo seco y, sin un diagnóstico adecuado, es posible que los pacientes no reciban la atención y el tratamiento que esta dolencia precisa. Los signos y síntomas del ojo seco pueden malinterpretarse como señal de otras afecciones, tales como la conjuntivitis infecciosa, alérgica o irritativa. Debido a estas complicaciones en el diagnóstico, se estima que la tasa de diagnóstico del ojo seco es del 20 %.

25 Diversas compañías farmacéuticas e instalaciones de investigación están formulando medicamentos para combatir y aliviar los síntomas del ojo seco, muchos de los cuales presentan una versión del tratamiento en ensayos de Fase III según la FDA. A la fecha de este escrito, se ha comercializado el primer producto con receta para el tratamiento del ojo seco, al que seguirán otros cuyo lanzamiento está programado para 2004, y otros dos para 2005 y 2006. Sin una manera fácil de medir objetivamente la ocurrencia del ojo seco, los médicos dependerán de una administración
30 subjetiva del fármaco, o bien un diagnóstico tardío o erróneo.

Métodos de Diagnóstico Objetivos Actuales

35 El diagnóstico del ojo seco generalmente comienza con el examen clínico. Generalmente, se lleva a cabo una prueba de Schirmer en la que se colocan unas tiras estandarizadas de papel de filtro en la vinculación entre el tercio medio y lateral del párpado inferior. Si después de 5 minutos se han humedecido menos de 5 milímetros, existen motivos para creer en la presencia de una deficiencia acuosa de las lágrimas. Aunque la prueba es rápida, económica, y los resultados están disponibles de inmediato, solo proporciona una estimación aproximada y no es fiable para un grado moderado del ojo seco.

40 La tinción con tinte es otro método para diagnosticar el ojo seco, ya sea con fluoresceína o rosa de Bengala, y, mediante observación con lámpara de hendidura, un médico capacitado podrá buscar patrones indicativos de sequedad. Otra prueba, el tiempo de desintegración de la película lagrimal, es una medida de la estabilidad de la película lagrimal. Una película lagrimal normal comienza a desintegrarse después de aproximadamente
45 10 segundos, y se acelera en los pacientes con ojo seco.

50 El osmómetro generalmente utilizado para medir la osmolaridad de las lágrimas es el osmómetro de lectura directa de Clifton Nanoliter (Clifton Technical Physics, Hartford, NY), desarrollado en la década de 1960. Aunque no fue originalmente diseñado necesariamente para medir lágrimas, es uno de los pocos instrumentos capaces de medir volúmenes de solución en nanolitros y se ha hecho con un hueco en la oftalmología.

55 El osmómetro de Clifton se produjo en cantidades limitadas a lo largo de los años, y no se usa rutinariamente fuera de los laboratorios de investigación. Se basa en la conocida técnica de medición denominada depresión del punto de congelación. El osmómetro de Clifton mide la osmolaridad mediante la medición de la depresión del punto de congelación de las lágrimas. En las mediciones de depresión del punto de congelación, en presencia de solutos disueltos, se produce una depresión en la temperatura de congelación del agua, que normalmente se congela a 0 °C, estando definida su relación matemática por la Ley de Raoult.

60 Aunque la prueba puede resultar precisa, se requiere un operario muy hábil para llevar a cabo la medición. La prueba monitorea la "depresión" al examinar ópticamente un volumen fraccional de una lágrima, con un microscopio. Debido a sus limitaciones y a la falta de disponibilidad, parece que solo quedan unas pocas unidades en el campo.

Además, cada medición puede requerir más de quince minutos, lo que, junto con los pequeños volúmenes de muestra, hace que el uso del osmómetro de Clifton sea un proceso extremadamente tedioso e inconveniente. El tiempo requerido y la habilidad operativa necesaria resultan inaceptables para una consulta o clínica concurrida, incluso si se contara con más unidades.

5 Lo que necesitan urgentemente los médicos que llevan a cabo exámenes de rutina es un dispositivo sencillo pero preciso, que pueda detectar, rastrear y ayudar a administrar tratamientos y medicamentos en una etapa temprana.

10 También sería beneficioso facilitar la detección temprana de otras enfermedades del ojo, y diferenciar entre los diferentes tipos de ojo seco, tales como la enfermedad del ojo seco basada en un aumento de la evaporación de la película lagrimal frente a la basada en la disminución de la secreción lagrimal. El ojo seco debido a la enfermedad de la glándula lagrimal da como resultado una disminución en la producción acuosa de las lágrimas, así como también una disminución de la secreción de proteínas por parte de la glándula lagrimal. En esta enfermedad, la osmolaridad de las lágrimas aumenta a medida que disminuye la concentración de proteínas. Por el contrario, en la enfermedad del ojo seco evaporativo, comúnmente causada por anchuras excesivas de la fisura palpebral o por una disfunción de la glándula de Meibomio, la osmolaridad aumenta y también aumenta la concentración de proteínas. Por lo tanto, para distinguir entre estas dos dolencias, resulta útil conocer la concentración de proteínas en cualquier muestra dada de lágrimas.

20 El documento US 2055/159657 A1 da a conocer un sistema de diagnóstico médico que comprende un aparato de resonancia de plasmón superficial, que tiene una superficie de detección para hacer contacto con una muestra de lágrima del ojo de un paciente y que, adicionalmente, cuenta con un dispositivo sensor de luz y un ordenador o microprocesador conectado operativamente a dicho dispositivo sensor de luz, para recibir desde el mismo una señal eléctrica que codifique un patrón de absorción de luz por parte de dicha superficie de detección. El ordenador o microprocesador está programado para analizar los datos del dispositivo sensor de luz, para determinar la osmolaridad de la muestra de lágrima.

30 La presente invención tiene como objetivo proporcionar un dispositivo y/o un método asociado para facilitar el diagnóstico de una o más enfermedades oculares. Más en particular, la invención pretende proporcionar un dispositivo para medir las concentraciones de al menos dos componentes de una muestra de lágrima que comprenda una concentración de sal. Un dispositivo de acuerdo con la invención mide la osmolaridad de las lágrimas para diagnosticar el síndrome del ojo seco.

Objeto de la invención

35 La presente invención contempla un dispositivo de este tipo, de acuerdo con la reivindicación 1, que evita al menos algunos de los problemas inherentes a los osmómetros convencionales, y en particular cuando se mide la osmolaridad en muestras con un tamaño en nanolitros. Preferentemente, el dispositivo es sencillo de usar, rentable para el médico y el paciente, y preciso, superando así los problemas asociados con los osmómetros para lágrima limitados principalmente a un entorno investigativo.

45 La presente invención utiliza en parte la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) como plataforma de detección para detectar analitos o marcadores químicos, que incluyen en particular antígenos, en una muestra de lágrima. La estrategia general implica inmovilizar anticuerpos específicos en la superficie del sensor de SPR, lo que conllevará la generación de señales, específicas para sus respectivos marcadores químicos, por ejemplo antígenos.

50 Esta característica de la presente invención, el uso de anticuerpos inmovilizados en la superficie de detección de SPR para detectar analitos o solutos tales como antígenos en una muestra de lágrima, se aprovecha de que las concentraciones conocidas de analitos antigénicos en una muestra de lágrima pueden facilitar el diagnóstico de enfermedades y afecciones oculares. Por ejemplo, el ojo seco debido a la enfermedad de la glándula lagrimal produce una disminución de la producción acuosa de las lágrimas y un aumento de la osmolaridad de la película lagrimal, así como una disminución de la secreción de proteínas por parte de la glándula lagrimal. En esta dolencia, la osmolaridad de las lágrimas aumenta a medida que disminuye la concentración de proteínas. Por el contrario, en la enfermedad del ojo seco evaporativo, comúnmente causada por anchuras excesivas de la fisura palpebral o por una disfunción de la glándula de Meibomio, la osmolaridad aumenta y también aumenta la concentración de proteínas. Por lo tanto, para distinguir entre estas dos dolencias, resulta útil conocer la concentración de proteínas en cualquier muestra dada de lágrima.

60 La presente invención reconoce que la SPR puede medir la concentración de proteínas totales, y que se ha usado como tal en muchas aplicaciones para el análisis de proteínas. La presente invención contempla el uso de un osmómetro de SPR para lágrimas, para medir la concentración de proteínas en una muestra de lágrima en nanolitros.

65 La presente invención está dirigida a un aparato que mide las concentraciones de uno o más solutos o analitos en volúmenes de solución en nanolitros, que incluyen en particular lágrimas humanas. El aparato mide las concentraciones de uno o más solutos antigénicos o analitos en muestras de lágrima humana. El aparato incluye un

espectroscopio de resonancia de plasmón superficial. Más en particular, el aparato incluye una fuente de luz, normalmente un láser, lentes, espejos, prismas, una superficie de detección de película delgada y un detector óptico. El aparato también incluye un ordenador, programado para analizar los datos en bruto y los valores de salida de la concentración de solutos o analitos de la solución en proceso de prueba.

5 La resonancia de plasmón superficial (SPR) es un fenómeno que ocurre cuando la luz incide sobre una interfaz dieléctrica metálica en un ángulo particular, de modo que se extingue la luz reflejada. En el ángulo particular de la luz incidente, la intensidad de la luz reflejada muestra una curva característica de intensidad decreciente, bien definida por ecuaciones matemáticas. La energía de la luz no reflejada es absorbida por la superficie metálica, y
10 provoca un modo oscilatorio (resonancia) de los electrones en el metal. La primera medición directa de oscilaciones de plasmón superficial se observó en 1959, y se estudió ampliamente en la comunidad de investigación científica a lo largo de los años setenta. Los científicos han utilizado esta técnica para medir el índice de refracción, las propiedades de las películas metálicas delgadas, por ejemplo, y hasta 1982 no se sugirió que la SPR podría ser útil como sensor químico. Desde entonces, la SPR se ha desarrollado hasta convertirse en una técnica versátil utilizada
15 en diversas aplicaciones. Estas incluyen estudios de absorbanza, bio-cinética y mediciones de biodetección, mediciones de líquidos a granel, detección de gases, mediciones del índice de refracción, y caracterización de películas delgadas. En 1992, comenzaron a comercializarse los sistemas de SPR en el mercado como una nueva herramienta de medición para la investigación a escala molecular. Uno de los principales atractivos de los sistemas de SPR fue la sensibilidad inherente de la medición, y la complementación de deficiencias observadas en otras
20 formas de medición espectroscópica.

Los componentes esenciales de un sistema de medición de SPR son relativamente sencillos. Compuesto principalmente por una fuente de láser, lentes simples, una superficie de detección de película delgada y un detector, puede hacerse que el sistema sea compacto con poco esfuerzo. Una versión de una superficie de
25 detección consiste en una película de oro delgada, de 50 nanómetros de grosor, que se deposita sobre el vidrio mediante tecnología de película delgada evaporada. En la práctica, resulta difícil producir el revestimiento fino de oro sin una amplia experiencia, o resulta complicado llevar a cabo iteraciones hasta lograr el espesor exacto requerido para que se produzca el fenómeno. Sin embargo, en el presente documento se describe un proceso para producir un revestimiento de película delgada patentado, que produce una fuerte señal de SPR, es duradero y resulta
30 adecuado para medir la osmolaridad de las lágrimas.

En la reivindicación 10 se define un método de prueba que comprende, de acuerdo con la presente invención, proporcionar un aparato de resonancia de plasmón superficial, proporcionar al aparato de resonancia de plasmón superficial una superficie de detección, poner una muestra de lágrima obtenida del ojo de un paciente en contacto
35 con la superficie de detección, y operar el aparato de resonancia de plasmón superficial para determinar una o más concentraciones de solutos o analitos de la muestra de lágrima. Los solutos o analitos son antigénicos, y se miden con una superficie de detección provista de anticuerpos para los solutos o analitos antigénicos.

El aparato de resonancia de plasmón superficial incluye un dispositivo de detección de luz y un ordenador o microprocesador, conectado operativamente al dispositivo de detección de luz, incluyendo la operación del aparato
40 de resonancia de plasmón superficial operar el dispositivo de detección de luz para transmitir al ordenador una señal eléctrica, que codifica un patrón de absorción de luz por parte de la superficie de detección, y operar el ordenador o microprocesador para analizar la imagen procedente del dispositivo sensor de luz.

45 La operación del ordenador o microprocesador incluye preferentemente operar el ordenador o microprocesador para comparar una posición de la línea de absorción con datos pregrabados y correlacionar la posición de la línea de absorción con la concentración de solutos o analitos (antigénicos).

De acuerdo con la invención, la operación del aparato de resonancia de plasmón superficial incluye operar el
50 dispositivo sensor de luz para transmitir al ordenador múltiples señales eléctricas por segundo, en la que cada una de las señales eléctricas codifica un patrón de absorción de luz por parte de la superficie de detección, estando separadas las señales eléctricas entre sí por al menos un intervalo de tiempo predeterminado. Adicionalmente, el ordenador o microprocesador se opera para analizar el patrón de absorción de luz codificado en cada una de las
55 señales eléctricas.

Cuando se mide la osmolaridad de las lágrimas con un dispositivo de SPR, se analiza la porción de la señal de SPR obtenida en los primeros milisegundos. Para una muestra dada de fluido lagrimal, que contenga tanto solución salina como proteínas, la solución salina comprende moléculas o iones pequeños que migran rápidamente a la superficie de detección. Las proteínas, al ser más voluminosas, tardan más en alcanzar la superficie de detección y unirse con
60 la misma. Al efectuar una medición basada en el tiempo en dos partes, se mide una primera señal que refleja la concentración de sal (osmolaridad) y una segunda señal, más amplia, que refleja la concentración de sal y proteínas a medida que las proteínas se unen a la superficie de detección. Se determina la concentración de proteínas a través de una sencilla sustracción de señales y un sencillo análisis (es decir, la señal mayor menos la señal menor es proporcional a la concentración de proteína).

65 El análisis por ordenador de los patrones de absorción de la luz determina las posiciones de la línea de absorción o

los ángulos de absorción máxima de la superficie de detección. Así, la operación del aparato de resonancia de plasmón superficial incluye más específicamente operar el ordenador o microprocesador para determinar un ángulo de resonancia superficial o una posición de la línea de absorción, a partir de cada una de las señales eléctricas.

5 Estos ángulos de resonancia o posiciones de la línea de absorción incluyen un primer ángulo de resonancia o primera posición de la línea de absorción, asociado con una primera de las señales eléctricas, temporalmente hablando, y un segundo ángulo de resonancia o segunda posición de la línea de absorción asociado con una señal posterior de las señales eléctricas. La operación del aparato de resonancia de plasmón superficial incluye adicionalmente operar el ordenador o microprocesador para comparar el primer ángulo de resonancia o la primera
10 posición de la línea de absorción con las entradas de una primera tabla de calibración, para determinar un primer valor de concentración de solutos, para sustraer el primer ángulo de resonancia o primera posición de la línea de absorción y el segundo ángulo de resonancia o segunda posición de la línea de absorción entre sí, para determinar un ángulo de resonancia o posición de la línea de absorción resultante, y para comparar el ángulo de resonancia resultante con las entradas de una segunda tabla de calibración para determinar una segunda concentración de solutos.
15

El aparato de resonancia de plasmón superficial puede adoptar la forma de una sonda portátil. Adicionalmente, proporcionar el aparato de resonancia de plasmón superficial con la superficie de detección puede comprender disponer una película metálica que lleve una funda, en una posición predeterminada en una punta operativa de la sonda.
20

De acuerdo con el método de la presente invención, colocar la muestra de lágrima comprende extraer la muestra de lágrima del ojo de un paciente y depositar la muestra de lágrima sobre la superficie de detección. La muestra de lágrima puede extraerse y depositarse usando una micropipeta. Alternativamente, la muestra de lágrima puede extraerse y depositarse usando un material poroso absorbente, tal como papel secante.
25

La presente invención contempla que la primera concentración de solutos sea una concentración de sal. Esto se debe a que la sal migra más rápidamente a la superficie de detección que los demás componentes de soluto de una muestra de lágrima. Concomitantemente, para obtener una posición de la línea de absorción o un ángulo de resonancia de la superficie de detección que solo corresponda a la concentración de sal en la muestra de lágrima, es necesario obtener una medición antes de que una cantidad sustancial de otros solutos (por ejemplo, proteínas, bacterias) tenga la oportunidad de migrar hasta la superficie de detección. En esa situación, el desplazamiento de la línea de absorción o del ángulo de resonancia de la superficie de detección con respecto a la posición de base (ángulo de refracción determinado por el disolvente, por agua, y no por ningún soluto) se debe solo a la
30 concentración de sal en la muestra de lágrima, y no a cualquier otra concentración de soluto. Preferentemente, la primera medición se obtiene tan pronto como la muestra de lágrima haga contacto con la superficie de detección. Sin embargo, un retardo no superior a 1/30 de segundo desde el momento de la deposición de la muestra de lágrima, sobre la superficie de detección, será generalmente lo suficientemente rápido como para que la señal de video inicial capture la concentración de sal con poco error, o sin error alguno, debido a concentraciones de otras
35 sustancias. Incidentalmente, cuando la sonda de medición hace contacto con una superficie ocular para obtener una muestra de lágrima, esta primera señal, así como varias mediciones posteriores, deberán hacerse necesariamente mientras la sonda todavía está en contacto con el ojo.
40

Un sistema de diagnóstico médico comprende un aparato de resonancia de plasmón superficial que tiene una superficie de detección para hacer contacto con una muestra de lágrima del ojo de un paciente, y que presenta adicionalmente un dispositivo sensor de luz y un ordenador o microprocesador, conectado operativamente al dispositivo sensor de luz para recibir del mismo una señal eléctrica que codifica un patrón de absorción de la luz, por parte de la superficie de detección. El ordenador o microprocesador está programado para analizar datos del dispositivo de detección de luz, para determinar un parámetro relacionado con una concentración de solutos de la muestra de lágrima en contacto con la superficie de detección.
45
50

El dispositivo de detección de luz puede ser una cámara, tal como un dispositivo de carga acoplada. En ese caso, la señal eléctrica es una señal de video. Alternativamente, el dispositivo de detección de luz puede ser un fotodiodo de elementos múltiples. En ese caso la señal eléctrica será una señal de diferencia analógica.
55

El ordenador o microprocesador incluye preferentemente medios para comparar una posición de la línea de absorción con datos pregrabados, y correlacionar la posición de la línea de absorción con la concentración de solutos.

60 En una realización de la presente invención, el aparato de resonancia de plasmón superficial incluye una carcasa manual portátil con una punta operativa, adaptada para facilitar el contacto de una superficie de detección de la punta operativa con una porción portadora de lágrimas del ojo de un paciente.

La superficie de detección de un aparato de resonancia de plasmón superficial de acuerdo con la presente invención puede incluir una primera capa de un primer metal, tal como oro, dispuesta sobre una segunda capa de un segundo metal, tal como cromo. Por supuesto, las combinaciones de capas metálicas de señal pueden resultar útiles.
65

La superficie de detección está provista de anticuerpos para el soluto o porción particular. Los anticuerpos pueden fijarse a las capas metálicas de la superficie de detección mediante quimisorción, por ejemplo, mediada por grupos tiol de los ligandos de los anticuerpos. Y mediante la fijación del anticuerpo relevante, puede medirse la concentración de cualquier antígeno en las lágrimas.

5 Una característica de la presente invención es su capacidad para medir volúmenes de lágrimas en nanolitros, un volumen habitualmente asociado con los pacientes con ojo seco y ojos normales. El aparato resulta útil para determinar la presencia y el grado del síndrome del ojo seco, ya que se sabe que los niveles de osmolaridad de las lágrimas se correlacionan con la gravedad del síndrome de ojo seco. La medición de la osmolaridad se obtiene de forma prácticamente instantánea una vez que se coloca la muestra sobre la superficie de detección, y por lo tanto no se surgen problemas de evaporación que podrían introducir errores.

Descripción de las figuras

- 15 La Figura 1 es un esquema óptico en sección transversal, que muestra los componentes básicos de un osmómetro de acuerdo con la presente invención.
La Figura 2a es un diagrama de una imagen vista por una cámara CCD del osmómetro de la Figura 1, sin una muestra sobre una superficie de detección.
20 La Figura 2b es un diagrama de una imagen vista por una cámara CCD del osmómetro de la Figura 1, con una muestra con una concentración de sal particular sobre la superficie de detección.
La Figura 2c es un diagrama de una imagen vista por una cámara CCD del osmómetro de la Figura 1, con una muestra con una concentración de sal aumentada sobre la superficie de detección.
La Figura 3a es un gráfico que muestra la intensidad característica frente a la posición de la curva angular en la que se produce la resonancia de plasmón superficial, cuando se deposita una muestra sobre la superficie de detección del osmómetro de la Figura 1.
25 La Figura 3b es un gráfico que muestra el resultado de dos muestras diferentes colocadas sobre la superficie de detección del osmómetro de la Figura 1, y el desplazamiento resultante en la curva característica.
La Figura 4a es un esquema óptico más detallado de un osmómetro de acuerdo con la presente invención.
La Figura 4b es un diagrama óptico que muestra una vista más detallada de la superficie de detección, el prisma hemisférico, la solución de muestra y la trayectoria de los rayos.
30 La Figura 4c es un diagrama que representa la imagen de la cámara CCD cuando se permite la diversión del haz para producir una línea más ancha.
La Figura 5 es una vista en perspectiva esquemática del ojo de un paciente y de una micropipeta, que muestra el proceso de extracción de una lágrima del paciente con la micropipeta.
35 La Figura 6a es una vista superior esquemática de la superficie de detección del osmómetro de la Figura 4a, con una gota de solución que cubre toda la imagen de la línea de láser.
La Figura 6b es una representación de la correspondiente imagen vista por la cámara CCD.
La Figura 6c es una vista superior esquemática de la superficie de detección del osmómetro de la Figura 4a, similar a la de la Figura 6a, que muestra una gota de solución que cubre solo la mitad de la imagen de la línea de láser.
40 La Figura 6d es una representación de la correspondiente imagen vista por la cámara CCD.
La Figura 7a es una vista superior esquemática de la superficie de detección del osmómetro de la Figura 4a, con una gota con volumen en nanolitros que cubre la pequeña porción de la imagen de la línea de láser.
La Figura 7b es una representación de la correspondiente imagen vista por la cámara CCD.
45 La Figura 7c es una vista superior esquemática de la superficie de detección del osmómetro de la Figura 4a, similar a la de la Figura 7a, que muestra cuatro gotas con un volumen en nanolitros que cubren varios puntos a lo largo de la imagen de la línea de láser.
La Figura 7d es una representación de la correspondiente imagen vista por la cámara CCD.
50 La Figura 8a es un gráfico que representa el resultado de colocar dos muestras diferentes sobre la superficie de detección. Muestra la intensidad de la disminución de la luz y luego se eleva de nuevo al representar la línea oscura que cae sobre el CCD. El desplazamiento en las dos curvas representa un cambio en la osmolaridad, y también muestra el componente de ruido presente en el sistema prototipo.
La Figura 8b es un gráfico que muestra un método de ajuste de línea recta para determinar el desplazamiento entre las dos curvas.
55 Las Figuras 9a y 9b son representaciones de imágenes generadas usando el osmómetro de la Figura 4a, que representa una etapa de adquisición de datos.
La Figura 9c es un gráfico que representa el análisis y el procesamiento, llevado a cabo por un ordenador o microprocesador, de una señal SPR para determinar la osmolaridad de una lágrima.
La Figura 10a es una vista esquemática en alzado frontal de un detector de fotodiodo de cuadrante, que puede utilizarse en un osmómetro de acuerdo con la presente invención.
60 La Figura 10b es una vista similar a la de la Figura 10a pero a mayor escala, que muestra dos señales de SPR superpuestas en cada mitad del cuadrante.
La Figura 11 es una vista en perspectiva esquemática de un osmómetro manual de SPR para lágrimas, en forma de una sonda manual, que miniaturiza y simplifica el instrumento.
65 La Figura 12 es una vista esquemática en alzado lateral parcial de la sonda de osmómetro de SPR para lágrimas manual de la Figura 11, que está tocando la película lagrimal del ojo en el área de la esclerótica.

La Figura 13 es una vista esquemática despiezada de la sonda de osmómetro de SPR para lágrimas de las Figuras 11 y 12, que muestra una superficie de detección desechable y una funda, una carcasa protectora, un núcleo óptico y una carcasa posterior de contención de componentes.

5 La Figura 14 muestra el esquema óptico detallado y la trayectoria de los rayos dentro y fuera del núcleo óptico de la sonda de osmómetro de SPR para lágrimas.

La Figura 15 es una vista en perspectiva esquemática de un soporte de micropipetas de precisión, que coloca con precisión una micropipeta sobre la superficie de detección de un osmómetro de acuerdo con la presente invención.

10 La Figura 16 es un diagrama del componente químico utilizado para inmovilizar un anticuerpo sobre una superficie de detección de oro de un osmómetro de SPR de acuerdo con la presente invención.

La Figura 17 es un diagrama de un esquema para tiorizar el anticuerpo de la Figura 16.

Descripción detallada de la invención

15 Se describirá ahora la invención con más detalle a modo de ejemplo, con referencia a las realizaciones mostradas en las figuras adjuntas. Debe tenerse en cuenta que las siguientes realizaciones descritas se presentan solo a modo de ejemplo, y no deben interpretarse como limitantes del concepto de la invención a cualquier configuración física particular.

20 En la Figura 1 se muestra en sección transversal una realización preferida de la presente invención. En la espectroscopia de SPR, interesa saber a qué ángulo la incidencia de luz que cae sobre la superficie de detección disminuye a cero, tras la reflexión. Se focaliza la luz de un láser mediante una lente cilíndrica 102, tras su reflexión desde un espejo angulado 104, para formar una imagen lineal 106 sobre la superficie 108 de detección revestida de oro. Dado que el haz de láser es convergente, 110, inciden a la vez múltiples ángulos de luz sobre la superficie de
25 detección. Una segunda lente cilíndrica 114 colima la luz reflejada 112 tras la reflexión desde un espejo angulado 116, opuesto al primero, cayendo sobre una cámara 118 de tipo dispositivo acoplado a carga (CCD). Sin una muestra sobre la superficie de detección, la imagen resultante observada por la cámara es simplemente un campo brillante 202, es decir, todos los píxeles del CCD captan la misma cantidad de luz mostrada en la Figura 2a.

30 Un objeto principal de la invención es determinar la osmolaridad de una muestra desconocida de solución, cuyos volúmenes sean del orden de nanolitros. La osmolaridad es esencialmente la concentración de sal en agua, y puede expresarse en unidades de miliosmos (mOs). La siguiente descripción describe cómo el aparato detecta cambios en la osmolaridad, con una posterior descripción más detallada.

35 En la configuración particular mostrada en la Figura 1, si se introduce una gota de agua sobre la superficie 108 de detección, se produce la resonancia de plasmón superficial, y la capa de oro de la superficie de detección absorbe completamente la luz de uno de los ángulos del haz convergente 110. La imagen resultante captada por la cámara 118 es el mismo campo brillante 202 con una línea horizontal oscura 204 en la imagen, como se muestra en la Figura 2b. Si ahora se pone un cristal de sal (es decir, sal de mesa) en la gota de agua sobre la superficie de
40 detección, la línea oscura en la imagen 206 se desplazará hacia arriba entre el campo brillante 202, a medida que se disuelva el cristal de sal (Figura 2c), indicando esencialmente un cambio en el índice de refracción. Esto corresponde a un desplazamiento en el ángulo ($\Delta\theta$) de la luz donde se produce la resonancia de plasmón superficial, es decir, un rayo diferente en el haz convergente 110. Si se trazara la intensidad en la dirección vertical (y) a través de la imagen mostrada en la Figura 2b, se obtendría la curva SPR 302 característica, que está
45 bien definida por ecuaciones matemáticas y se muestra en la Figura 3a. Aumentar la concentración de sal en la gota de agua en la superficie de detección, agregando más sal, obligará a la línea oscura a moverse adicionalmente de manera vertical. Si se trazara la intensidad de la línea oscura en las Figuras 2b y 2c, se observaría un desplazamiento lateral en la curva SPR 304 indicativo de un cambio en el ángulo donde se produce el fenómeno, como se muestra en la Figura 3b en forma de $\Delta\theta$ (306), y estará directamente relacionado con el cambio en la
50 osmolaridad. Por lo tanto, con la calibración podemos determinar la concentración exacta de sal o la osmolaridad de una solución desconocida.

Consideraciones Prácticas del Sistema

55 Ahora se describirá un examen más detallado de la presente invención. Con referencia a la Figura 4a, un osmómetro de tipo SPR para lágrimas en nanolitros utiliza un módulo 402 de diodo láser (láser de diodo más ópticas de colimación y visualización circular) como la fuente de luz, con una longitud de onda igual a 670nm, sin embargo, puede usarse cualquiera de los diversos tipos de fuente de láser - gas, estado sólido, semiconductor, etc. Para que se produzca la SPR, la luz del láser debe estar polarizada en un plano paralelo a la superficie de detección, y por lo tanto se inserta un filtro 404 de polarización en el haz láser, asegurando un plano de polarización. La SPR puede observarse virtualmente a cualquier longitud de onda de luz, pero en el presente documento se describirá usando 670nm ('rojo') ya que el prototipo fue diseñado para funcionar a esa longitud de onda.

65 Después del filtro de polarización, se usa un filtro espacial 406 (que consiste en una lente de distancia focal corta y un poro) para eliminar cualquier posible ruido del haz láser. Los haces láser no filtrados contendrán ruido espacial de partículas del aire, el polvo en las lentes, etc., y el resultado será un haz con patrones de difracción no deseados que

pueden agregar complejidad al procesamiento de imágenes durante el análisis de datos. La lente y el poro en el filtro espacial se eligen para la longitud de onda del láser particular, para optimizar el filtrado (es decir, lente de longitud focal de 6 mm y el poro de 10 micrones de diámetro).

5 La luz que sale del filtro espacial es divergente, y se colima con una lente esférica 408. Tras la colimación, la luz entra en una lente cilíndrica 410 y se focaliza el haz para formar una imagen lineal 412. La superficie 414 de detección en la que va a colocarse la muestra de lágrima debe ser horizontal (en el caso más sencillo): si fuera vertical, la muestra de lágrima tendería a caerse. Por lo tanto, un espejo angulado 416 intercepta el haz antes de alcanzar el foco y desvía la imagen lineal a una superficie 414 de detección, colocada horizontalmente. La razón por
10 la que se usa una lente cilíndrica (en lugar de una lente esférica) es para producir una imagen lineal enfocada. Dada esta imagen lineal, puede colocarse una muestra de lágrima en cualquier lugar de la línea y podrá observarse una señal de SPR; adicionalmente, pueden analizarse múltiples muestras a la vez si se colocan a todo lo largo de la imagen lineal.

15 La lente cilíndrica genera un frente de onda cilíndrico convergente y una imagen lineal enfocada en la superficie de detección. Para que se produzca la SPR, la luz del láser deberá estar en un medio dieléctrico (es decir, vidrio) y luego incidir sobre la superficie de detección de oro. Esto se logra generalmente por medio de un prisma equilátero, con el oro depositado en la base del prisma. Sin embargo, las caras planas del prisma introducirán la refracción de cada rayo incidente, y para simplificar las operaciones matemáticas se usa un "prisma" cilíndrico 417. Este prisma es
20 la mitad de un cilindro fabricado de vidrio óptico. Puede fabricarse convenientemente mediante el rectificado sin centros de una varilla de un vidrio particular, y luego puliendo el diámetro exterior. La varilla puede rectificarse entonces por la mitad, a lo largo del eje del cilindro, y se pule la parte plana de la cara del cilindro para producir un "hemicilindro". Al usar un prisma cilíndrico las superficies no presentan refracción, ya que todos los rayos que entran en el prisma son perpendiculares a la superficie. La superficie de detección puede ser simplemente la cara pulida del
25 prisma cilíndrico, y puede depositarse una delgada película de oro directamente sobre esta superficie. Sin embargo, en la práctica el prisma cilíndrico se hizo 1 mm inferior a un hemicilindro completo, y se hicieron unas placas planas de vidrio del mismo material, con las mismas dimensiones que la cara plana del cilindro, con un grosor de 1 mm. Es en estas placas de vidrio en la que se deposita el oro que forma la superficie de detección, ya que es más fácil fabricar muchas de estas placas que prismas. El prisma cilíndrico y las placas de vidrio con oro depositado se ensamblan entre sí, con un fluido de ajuste del índice, de modo que con la luz entrante el conjunto parezca una
30 unidad (es decir, no habrá cambios en los medios y, por lo tanto, reflejos entre el prisma cilíndrico y las placas de vidrio). La Figura 4b muestra un prisma cilíndrico 430 y una superficie 432 de detección con oro depositado, ensamblada con un fluido de adaptación del índice con una gota 433 de muestra sobre la superficie de detección. Adicionalmente, muestra múltiples rayos de luz en ángulo que entran en el prisma por la referencia 434 y salen del prisma por la referencia 436, en ambos casos sin refracción.

La deposición del oro sobre las placas de vidrio es un proceso difícil, ya que se requiere un espesor exacto del oro para una señal de SPR fuerte. Para una mayor complejidad, cuando se deposita al vacío, el oro no se adhiere muy bien al vidrio y, como tal, el simple hecho de limpiar la superficie eliminaría el oro depositado. Para hacer que el oro
40 sea más robusto, se utiliza la conocida técnica de depositar primero cromo. En nuestro sistema, se depositan 2-5 nanómetros de cromo seguidos de 50 nanómetros de oro. En la práctica resulta algo difícil obtener exactamente 50 nanómetros de oro, y se llevaron a cabo varias pruebas para calibrar las cámaras de recubrimiento por evaporación, para lograr un espesor utilizable de entre 50 y 55 nanómetros de oro aproximadamente. Resulta que la cantidad de cromo utilizado también puede resultar crucial. Si se usa muy poco cromo, el oro no será muy duradero y tendrá
45 tendencia a desprenderse durante la manipulación o el uso. Si se usa demasiado cromo, se observará una señal de SPR baja o incluso no se observará señal alguna.

Como el frente de onda que entra en el prisma es convergente, esto significa que un intervalo de ángulos incidirá sobre la superficie de detección. El mínimo de SPR se produce solo en un ángulo particular para una solución dada.
50 Por ejemplo, si el medio que rodea la superficie de detección es aire, el ángulo en el que se producirá la SPR (intensidad reflejada mínima) será ~ 33 grados. Si se introduce agua como medio sobre la superficie de detección, en forma de una gota 433 como se muestra en la Figura 4b, la SPR se producirá a -54 grados. Dado que el objeto de la invención comprende medir concentraciones variables de sal disuelta en agua, y existe un intervalo de osmolaridades de la lágrima humana que determinan la presencia y el grado del ojo seco, el aparato presenta un
55 intervalo de ángulos (intervalo dinámico) que están dentro del intervalo de ocurrencia de la SPR para estas soluciones. Por ejemplo, nuestro sistema tiene un haz convergente de +/- 5 grados. El intervalo de osmolaridad de la lágrima humana es de aproximadamente 300mOs a 400mOs. En un sistema ideal, podría asignarse una fracción de grado para por ejemplo 1 mOs, y determinar la osmolaridad con extrema precisión. Sin embargo, en la práctica el cambio en el ángulo a medida que cambia la osmolaridad es muy pequeño, del orden de 0,1 grados sobre el
60 intervalo de 300-400mOs, lo que presenta complicaciones de cara a detectar las señales.

Con referencia de nuevo a la Figura 4a, después de permitir la focalización de la luz para formar una imagen lineal, ésta se reflejará y divergirá desde la superficie de detección de oro. En caso de que haya una muestra colocada, la imagen reflejada mostrará una línea oscura, que se muestra de manera general en la Figura 3a o b. Esta luz saliente
65 se refleja mediante un espejo 418, colocado de manera similar en un ángulo opuesto al primero, para curvar la luz de vuelta sobre el eje óptico original del láser. Una segunda lente cilíndrica 420 colima luego esta luz divergente.

Puede colocarse una cámara 424 de dispositivo de carga acoplada (CCD) perpendicular al haz de luz, y obtenerse un campo brillante con una línea oscura a modo de señal de video para su posterior procesamiento. Sin embargo, dado que nuestro cambio en el ángulo es pequeño, del orden de 0,1 grados, esto genera un desplazamiento vertical de la línea oscura con respecto a los valores extremos de osmolaridad de meramente 10 micras o más, aproximadamente el tamaño de un píxel en la cámara CCD. Aunque es posible detectar el movimiento de la línea a menos de un píxel mediante técnicas de procesamiento de imágenes, puede aumentarse ópticamente el movimiento de la línea. En su lugar, puede insertarse una lente 422 de longitud focal corta después de la lente cilíndrica 420 para el haz colimado, que focalice el haz a un punto pequeño y luego le permita divergir. Si se coloca la cámara CCD 424 tras permitir la divergencia del haz, el haz se agrandará rápidamente, y el resultado será una línea oscura grande 438 (que cubrirá quizás $\frac{3}{4}$ del área activa del CCD 442) rodeada por un campo brillante 440, que se muestra en la Figura 4c. En este caso, la línea oscura cubrirá muchos píxeles, al igual que su movimiento, y podrán detectarse más fácilmente los movimientos pequeños. La imagen en el CCD se captura con el capturador 428 de fotogramas, montado en el ordenador personal 426.

15 Medición de la Osmolaridad de las Lágrimas con Espectroscopia de SPR

Ahora que se han descrito adecuadamente las complejidades del sistema, a continuación se describirá su uso como un osmómetro para lágrimas en nanolitros.

20 Existen dificultades inherentes al manejo de volúmenes de muestras en nanolitros - la cantidad máxima de líquido lagrimal que generalmente puede recolectarse de un paciente. Extraer la muestra al paciente es relativamente sencillo, sin embargo, insertar dicha muestra en un instrumento puede causar dificultades. En los osmómetros que utilizan la técnica de depresión del punto de congelación, debe congelarse la muestra para permitir la descongelación de la misma, y el punto de descongelación total está relacionado con la osmolaridad. Cuando las muestras son pequeñas entra en juego el riesgo de evaporación y, si esto ocurre, se obtendrá una lectura incorrecta de la osmolaridad. Adicionalmente, debe colocarse la muestra de lágrima en nanolitros en algún tipo de mecanismo de congelación (es decir, una placa de enfriamiento termoeléctrica), que se observa microscópicamente. En resumen, se ha observado que es un proceso muy difícil obtener datos fiables con los osmómetros de depresión del punto de congelación, u obtener un dispositivo que sea fácil de usar. Los osmómetros basados en la depresión del punto de congelación son mucho más adecuados para medir muestras de mayor tamaño (mililitros).

Un hecho interesante relativo a la SPR es que el fenómeno se producirá independientemente del tamaño de la muestra. Siempre que la solución esté en contacto con la superficie de detección, y cubra la luz láser focalizada (línea), se producirá la SPR. En el aparato prototipo, el ancho de la línea de láser focalizada era de aproximadamente 5 micras, y la experimentación ha demostrado que los volúmenes de muestra en nanolitros producen señales SPR idénticas a las muestras de tamaño en mililitros.

Calibración

40 Para medir una osmolaridad de la muestra de lágrima, primero se calibra el aparato mediante soluciones de osmolaridad conocidas en laboratorio. La medición precisa de cloruro de sodio y la disolución en agua destilada triple produjeron varias soluciones con diferente osmolaridad. Cada una de estas soluciones se deposita sobre la superficie de detección, y en ese mismo instante se forma una línea oscura en la imagen. La señal de la cámara CCD, que captura la imagen, se alimenta a un capturador 428 de fotogramas instalado en un ordenador personal 426, y se digitaliza la imagen mediante el capturador de fotogramas y se almacena en el ordenador (Figura 4a). Este proceso se lleva a cabo para muchas soluciones, y se obtiene una imagen para cada una de las mismas.

50 Ahora que el ordenador cuenta con varias imágenes de un campo brillante con una línea oscura, detecta el movimiento vertical de la línea oscura entre una solución y otra. El resultado es una curva de calibración que se almacena en el ordenador, para su posterior recuperación. Si ahora se deposita una solución con osmolaridad desconocida sobre la superficie de detección, el ordenador puede encontrar la posición vertical de la línea, compararla con los datos de la solución de calibración, y emitir la osmolaridad de la solución desconocida en unidades de miliosmo.

55 Celda de Flujo

60 Para simplificar el proceso de calibración (la deposición de muchas soluciones con diferente osmolaridad sobre la superficie de detección), se construyeron un sistema de bomba y una celda de flujo. Este sistema consiste esencialmente en un orificio de entrada de fluido, una pequeña cámara de retención, y un orificio de salida de fluido. La unidad descansa sobre la superficie de detección, y una junta tórica de silicona hace contacto con la superficie de detección. La unidad está atornillada en su sitio, y la compresión de la junta tórica sobre la superficie de detección crea un sello a prueba de fugas. Al orificio de entrada está fijado un tubo, cuyo otro extremo está conectado a una pequeña bomba. La entrada de la bomba extrae el fluido de calibración, lo envía a la celda de flujo y lo hace pasar a través de la cámara de retención, saliendo por el orificio de salida. Una vez que el fluido cae sobre la superficie de detección, aparece una línea oscura en la imagen a una altura vertical, y el ordenador la graba. Para medir otras

soluciones, primero se inserta en el agua el tubo que da a la entrada de la bomba, para lavar la superficie de detección, a lo que sigue una solución con diferente osmolaridad a la de la primera, y se repite el proceso. Esto le da al ordenador un conjunto completo de datos en un corto período de tiempo, en comparación con dejar caer manualmente una gota de una solución, grabar la imagen, eliminar la gota, lavar con agua, aplicar la siguiente gota, etc.

Extracción de Lágrimas

La extracción de lágrimas de un paciente se lleva a cabo usando una micropipeta de vidrio. Observando con una lámpara de hendidura, el médico coloca la micropipeta 502 cerca del párpado inferior y simplemente en contacto con la línea de agua 504 para que se produzca la capilaridad 506 del fluido lacrimógeno (~ 200 nanolitros) hacia la micropipeta (véase la Figura 5).

La punta de la micropipeta se estrecha desde el cuerpo capilar, de 3 mm, hasta aproximadamente 0,5 mm, y está curvada en ángulo con respecto al cuerpo. Esto es así para que, durante la extracción de lágrimas, puede alejarse de la cara el cuerpo de la pipeta y el proceso no estimule una producción excesiva de lágrimas, lo que podría alterar la lectura de la osmolaridad.

Ahora que la muestra de lágrima está contenida en la punta de la micropipeta, existen ciertas dificultades para sacar la lágrima y colocarla con precisión. Esto se hace de manera habitual a mano, sin embargo, con un instrumento comercial se precisa una forma más conveniente. Debe introducirse presión de aire para superar la acción de capilaridad, para forzar la lágrima fuera de la micropipeta. Esto puede hacerse con una bola de presión, o simplemente soplando en el extremo. El problema principal de manipular volúmenes de muestra en nanolitros es que son muy pequeños, y todas las fuerzas (es decir, la tensión superficial) cerca de la muestra son mayores que la masa de la muestra, que en consecuencia tenderá a verse arrastrada hacia el objeto más cercano o al que presente la mayor tensión superficial. Cuando se expulsa la lágrima de la micropipeta con una leve presión de aire, la muestra de lágrima tenderá a salir de la micropipeta y a rodar hacia el lado de la pipeta debido a la tensión superficial. Sin embargo, si al salir de la pipeta, pero todavía adherida al extremo, se coloca la muestra de lágrima muy cerca de otra superficie (es decir, la superficie de detección), la tensión superficial de la superficie de detección arrastrará la muestra sobre la superficie. Esto requiere una cantidad considerable de habilidad y de práctica. Para complicar aún más las cosas, la muestra de lágrima deberá quedar directamente sobre el haz láser focalizada sobre la superficie de detección. Por lo tanto, se contempla un sistema que extraiga la muestra de lágrima de la micropipeta y la coloque con precisión sobre la superficie de detección. Un método hace uso de un sistema de microdispensación, que está disponible comercialmente. Este sistema utiliza una presión de aire precisa para expulsar una cantidad exacta de líquido de una jeringa (en este caso una micropipeta) y esto, en combinación con un sistema de microposicionamiento que acercará la punta de la micropipeta a la superficie de detección, permitirá una dispensación y colocación precisas de la muestra de lágrima sobre la imagen lineal láser focalizada. Se han efectuado otros estudios que hacen uso de la fuerza eléctrica para dispensar una pequeña gota de fluido.

La colocación de la lágrima sobre la superficie de detección puede hacerse de manera sencilla con un sistema de microposición de 3 ejes (traslación), que sostenga la micropipeta verticalmente con la punta orientada hacia la superficie de detección. El ajuste de los 3 ejes mediante tornillos de control, hasta que la punta esté justo encima de la superficie de detección y casi en contacto con la misma, puede efectuarse a mano y mediante inspección visual. Sin embargo, esto no resulta conveniente (y además es potencialmente costoso) de cara a un producto comercial. La fabricación de micropipetas personalizadas con una tolerancia específica, de manera que pueda insertarse la micropipeta en un accesorio montado sobre la superficie de detección y pueda repetirse su posición, es un método para el posicionamiento sencillo y preciso de la lágrima sobre la superficie de detección. La Figura 15 muestra un accesorio 1502 que se usó para colocar hasta tres puntas 1504 de micropipeta sobre y a lo largo de la línea 1506 de láser focalizada, sobre la superficie 1508 de detección.

Otro método para extraer la lágrima puede efectuarse con un material absorbente (es decir, papel), el cual, al entrar en contacto con la película o línea lagrimal, absorba la muestra de lágrima. Este papel mojado puede ponerse entonces en contacto con la superficie de detección, y, al igual que antes, aparecerá una línea oscura en la imagen. La ventaja de usar una tira de papel para absorber la muestra de lágrima es que no se necesita un microscopio con lámpara de hendidura para la extracción.

Características de la Imagen y Tamaño de la Muestra

Dependiendo de cómo se deposite sobre la superficie de detección una solución a comprobar, se determinarán las características de la imagen final. Sin embargo, todos los métodos revelarán una línea vertical oscura, rodeada por un campo brillante. Con referencia a la Figura 6a, en 602 se muestra la vista superior de la superficie de detección rectangular. La lente cilíndrica del sistema enfoca la luz láser para formar una imagen lineal 604 sobre la superficie de detección, como se muestra en la figura. Sobre esta superficie de detección, y cubriendo la imagen lineal, se deposita la solución 606 de muestra. La imagen correspondiente es una línea oscura horizontal 608 en un campo brillante 610, que se traslada verticalmente con el cambio en la osmolaridad. Sin embargo, la longitud de esta línea está determinada por la cantidad de solución que cubre la línea láser focalizada. Si la solución 612 solo cubre la

mitad de la línea láser 614 sobre la superficie 616 de detección, como se muestra en la Figura 6b, la línea oscura 618 resultante en la imagen solo cubrirá la mitad de la cámara CCD, y el resto será un campo brillante 620.

5 Sin embargo, cuando se trata de lágrimas con volúmenes 702 en nanolitros, al colocarlas sobre la superficie 704 de
 5 detección, solo cubrirá una pequeña fracción de la imagen lineal 706 de láser. El resultado en la imagen del CCD
 será un campo brillante 708 con una línea oscura 'corta' 710. Esto se muestra pictóricamente en la Figura 7a. A
 medida que cambia la osmolaridad de la lágrima, esta línea corta se moverá verticalmente en la imagen. Cabe
 observar que, dado que la superficie de detección es grande en comparación con el volumen de la lágrima, resulta
 10 concebible que pueda colocarse de una vez más de una lágrima (es decir, del ojo derecho y el ojo izquierdo) sobre
 la superficie de detección, obteniendo lecturas inmediatas de ambas. Adicionalmente, pueden colocarse varias
 lágrimas a la vez sobre la superficie, obteniendo múltiples lecturas. La Figura 7b muestra cuatro muestras 711, 712,
 714, 716 de lágrima con diferente osmolaridad sobre la superficie 718 de detección, y la imagen resultante en la
 cámara CCD que muestra cuatro líneas oscuras 722, 724, 726, 728 en diferentes posiciones verticales entre un
 15 campo brillante 730. Las diferentes posiciones verticales de las líneas indican la diferente osmolaridad de cada
 muestra.

Rutinas de Procesamiento de Imagen para Determinar la Posición Vertical de la Línea Oscura

20 Como se describió anteriormente, en las Figuras 2a y 2b se muestra la imagen captada por la cámara CCD cuando
 se introduce una solución sobre la superficie de detección. En la práctica, sin embargo, esta imagen solo contiene un
 campo brillante y una línea oscura, pero también ruido (manchas brillantes y oscuras) procedente de reflejos
 espurios y de la difracción no deseada de muchas fuentes, incluso si se cuenta con un filtro espacial. El ruido
 general puede causar una incertidumbre a la hora de determinar la posición de la línea oscura. Sin embargo, incluso
 25 con este ruido, puede observarse la señal SPR característica de intensidad decreciente (véase la Figura 3), y puede
 lograrse una medición fiable con promediación simple. Sin embargo, al medir la osmolaridad, deberán detectarse
 diferencias en el orden de 1 mOs o menos, lo que representa un cambio muy pequeño en el ángulo de SPR o del
 mismo modo en la posición vertical de la línea oscura en la imagen. Por lo tanto, es necesario que el ordenador
 procese cada imagen capturada por la cámara CCD para eliminar el componente de ruido o, al menos, reducirlo.

30 La imagen de la línea oscura mostrada en la Figura 2 no es representativa de la imagen real obtenida con el
 sistema. En un sistema ideal en el que esté presente una señal de SPR, si la intensidad de la luz que cae sobre la
 cámara CCD se trazara verticalmente a lo largo de una columna de píxeles del CCD, el resultado sería la curva
 mostrada en la Figura 3. En realidad, esta curva presenta componentes de ruido aleatorio. Para determinar con
 precisión la osmolaridad de una solución, el ordenador deberá encontrar el mínimo de esta curva y compararlo con
 35 las tablas de calibración. Cuanto más exactamente pueda determinar el ordenador automáticamente la ubicación del
 mínimo, más precisa será la medición de la osmolaridad. Si hay demasiado ruido presente, el ordenador puede
 interpretar erróneamente el ruido como un mínimo de la SPR, e informar de un valor incorrecto de osmolaridad.
 Además de la presencia de ruido, puede ser que el ordenador no sea capaz de detectar un pequeño cambio en el
 movimiento de la línea vertical cuando se midan soluciones con valores de osmolaridad cercanos (es decir,
 40 312,0 mOs y 312,5 mOs). Para que las mediciones de osmolaridad sean útiles a nivel clínico, el sistema informará
 preferentemente de la osmolaridad con un margen de 1-2 mOs con respecto a su valor real. Teóricamente, el
 sistema podría detectar cambios de hasta 0,1 mOs, lo que probablemente sea insignificante desde el punto de vista
 clínico.

45 Cuando no hay una muestra sobre la superficie de detección, la imagen de "referencia" consiste en una mancha
 brillante de luz. Esta mancha brillante de luz contiene ruido (espacial). Este ruido generalmente consiste en patrones
 de difracción y otras manchas causadas por pequeños arañazos o picaduras en la lente, partículas de polvo, etc.
 Adicionalmente, la intensidad de la luz láser está distribuida de acuerdo con la ley de Gauss. Todas estas
 características no deseadas en la imagen de referencia están presentes cuando se coloca una muestra en la
 50 superficie de detección y se forma una línea oscura debido a la SPR. Para eliminar este ruido espacial no deseado,
 el ordenador puede sustraer las dos imágenes, eliminando así estas características de la imagen procesada. Sin
 embargo, se produce una diferencia de amplitud entre la imagen de referencia y la imagen con la línea oscura, por lo
 que se determina un factor de escala analizando la misma pequeña porción de cada imagen y comparando el valor
 de píxel promedio entre las dos áreas. El resultado es un campo oscuro con una línea blanca brillante, en el que el
 55 componente de ruido espacial está minimizado.

Incluso después de la sustracción habrá otras fuentes de ruido presentes en la señal. Se trata de fluctuaciones
 predominantemente aleatorias, tales como ruido electrónico, que dificultan la determinación de la ubicación exacta (o
 60 cambio de ubicación) de la línea oscura.

Un método consiste en monitorear no solo el píxel de la intensidad mínima representativa del mínimo de la línea
 oscura, sino monitorearlo y varios píxeles alrededor del mismo. La porción inferior de la curva de SPR que contenga
 el punto de intensidad mínima puede aproximarse, como una parábola. El programa informático ajusta una parábola
 a los puntos que rodean al mínimo, y luego monitorea todos los puntos de la parábola. De esta manera, si se
 65 produce un cambio en la parábola de incluso menos de un píxel, el ordenador puede detectarlo, lo que generalmente
 se conoce como resolución subpíxel.

Si se ensancha la línea utilizando la lente divergente mostrada en la Figura 4a, se logra un mayor movimiento vertical de la línea oscura. Si se trazara la intensidad de arriba a abajo del CCD, se obtendrá una versión truncada de la curva de la Figura 3a. Si se comprueban dos soluciones y se examina la intensidad en el CCD en cada instante, se obtendrán dos curvas truncadas ensanchadas. En la Figura 8a se muestran las curvas reales de dos soluciones comprobadas en el instrumento prototipo. Estas curvas muestran la intensidad decreciente de la luz láser reflejada desde la superficie de detección, con una muestra en su sitio, y contienen ruido, que en la figura se observa como ondulaciones de alta frecuencia en una curva por lo demás suave. Cada curva está ligeramente desplazada entre sí, lo que indica un cambio en la osmolaridad. La distancia entre estas curvas o el desplazamiento se mide para determinar el valor de la osmolaridad para la solución dada. Una forma de medir el desplazamiento entre las curvas mostradas en la Figura 8a es ajustar una línea recta a cada lado de la curva. Puede observarse el punto en el que se cruzan estas líneas, y esto se hace para cada curva. Esto producirá dos puntos distintos separados por una distancia, y esta distancia es representativa del cambio en las curvas reales. Esto se muestra en la Figura 8b.

Otro método de detección exitosa de la posición vertical de la línea oscura consistió en encontrar la posición promedio, trazar los datos y encontrar el centro ponderado de la curva. Resulta beneficioso normalizar los datos primero, de modo que no sea necesario determinar los valores de corte para cada solución. La Figura 9 muestra el proceso de análisis de datos usando el método centroide. La colocación de una muestra de lágrima sobre la superficie de detección genera una imagen en el CCD con una línea oscura, que cubre una parte del campo horizontal entre un campo brillante en alguna posición vertical 902. Se adquiere y almacena un fotograma de video en un PC. Puede escribirse un programa informático que permita al usuario seleccionar una región 904 de interés en la imagen, es decir la línea oscura y una porción del campo brillante arriba y debajo de la línea, marcando y arrastrando con un ratón. Se presiona un botón y el software comienza a promediar la región de interés seleccionada con el ratón. El software promedia el brillo de todos los píxeles en cada fila horizontal de la región, para alcanzar un valor de brillo para cada fila. Los datos resultantes pueden considerarse como la región colapsada en una sola línea vertical, de la misma altura que la región original, siendo cada punto de la línea tan brillante u oscuro como el promedio de toda la fila lateral de la región original en esa altura. Esto produce una sola curva, que representa la posición vertical media de la línea oscura 906.

Agregar una muestra con una osmolaridad diferente provoca un desplazamiento de la curva, produciendo dos curvas SPR 906 y 908 de formas similares pero trasladadas lateralmente. El procesamiento continúa creando un nivel 910 de corte para separar el pico del resto de la curva, y calcula el centro de gravedad o centroide de los puntos de datos restantes en el pico. Este método es más sólido que elegir un único vértice de la curva, ya que implica más datos cerca de la curva en su resultado final, y algunas curvas pueden ser extrañamente asimétricas y presentar vértices inexactos. Se centra cada una de las secciones de pico de curva generadas a partir de soluciones con diferentes osmolaridades, y debajo se dibuja una marca 912 y se le asigna un valor en una escala horizontal, que puede calibrarse según el valor de osmolaridad de la solución.

Método del Fotodiodo y Diseño de la Sonda

Otra configuración de un osmómetro de SPR para lágrimas implica reemplazar la cámara CCD con un fotodiodo de elementos múltiples. La miniaturización está concebida para desempeñar un papel en el éxito de un dispositivo médico comercial, ya que por razones prácticas el médico practicante no puede usar todos los instrumentos tecnológicos disponibles en su campo, simplemente debido a una falta de espacio en la consulta. Eliminar la cámara CCD del sistema puede no suponer un ahorro económico sustancial desde el punto de vista de los componentes; se ahorrará en el hardware de procesamiento posterior (es decir, el capturador de fotogramas, el ordenador). El uso de una cámara CCD simplemente simplifica las cosas para el personal de investigación, y el uso de un ordenador permite realizar cambios rápidamente. Los ordenadores son problemáticos y suponen un gasto extra, por lo que en muchos sentidos resulta deseable contar con dispositivos autónomos, incluso portátiles.

Se construyó un sistema de osmómetro de SPR para lágrimas con todos los mismos componentes que se han descrito anteriormente, pero reemplazándose la cámara CCD (Figuras 1 y 4) por un fotodiodo (Segmented Quadrant Photodiode de UDT Sensors, Inc.) de 4 elementos (cuadrantes). En la figura 10a se muestra un "detector cuádruple", que consiste esencialmente en 4 fotodiodos 1002 sobre el mismo sustrato con un pequeño espacio muerto 1004 en el medio. En este caso, la posición vertical de la línea oscura se determina al permitir que una porción de la línea oscura esté situada encima y una porción esté situada debajo de los cuadrantes superior e inferior, como se muestra en la Figura 10b. Los cuadrantes derechos 1006 superior e inferior podrían representar una muestra tomada del ojo derecho, con un valor de osmolaridad y una posición vertical de la línea oscura 1008 particulares, y los cuadrantes izquierdos 1010 superior e inferior una muestra del ojo izquierdo con la correspondiente línea oscura 1012. Un fotodiodo genera una corriente cuando la luz incide sobre la superficie. Cada uno de los fotodiodos superior e inferior generará su propia corriente en función de la cantidad de luz que incida sobre los mismos, que se ve afectada por la posición de la línea oscura. En la práctica, las corrientes se amplifican (OPA-128 Current Op-Amp, de Burr-Brown Corp.) y se convierten en tensiones que puedan compararse, y puede inferirse la posición relativa de la línea oscura (SPR mínimo). Puede hacerse un procesamiento muy similar al descrito con la imagen obtenida por el CCD, sin embargo, en el caso del fotodiodo, se trata en cambio con voltajes analógicos. Los voltajes analógicos pueden digitalizarse con un ordenador o, preferentemente, con un microprocesador que pueda operar en los voltajes

digitalizados para producir un valor correspondiente a la posición de la línea oscura y, por lo tanto, a la osmolaridad de la muestra.

El uso de un fotodiodo como detector y de elementos electrónicos integrados para el procesamiento de señales, de micro óptica, y de configuraciones prismáticas novedosas puede reducir drásticamente el tamaño de todo el sistema, y constituirá un instrumento que podría producirse en grandes cantidades de forma relativamente económica. Aunque se han propuesto numerosas configuraciones para espectroscopia de SPR para el análisis de agentes químicos y biológicos, ninguno ha sido específico para la osmolaridad de las lágrimas y las dificultades asociadas con el tamaño de muestras en nanolitros, con la resolución, la colocación de la muestra, etc.

El nivel de complejidad del sistema óptico de un espectroscopio de SPR es lo suficientemente sencillo como para poder miniaturizarse en una sonda de mano. Siempre que el ángulo de luz incidente sea correcto,

La SPR se producirá sin importar el volumen de la solución, es decir, en lugar de sondear la línea de agua y capilarizar el fluido lagrimal hacia una micropipeta, puede ponerse la superficie de detección del instrumento en contacto con la propia película lagrimal. Esto elimina el paso de tener que extraer la lágrima y resuelve los problemas de colocación de las lágrimas sobre la superficie de detección. La Figura 11 muestra un modelo informático de una sonda de osmómetro para lágrimas, y un mango 1102 de la sonda, que incluye un botón 1106 que se presiona para efectuar la medición, contiene todos los componentes necesarios del sistema de SPR.

La sonda tiene una punta 1104 que es de vidrio óptico, con un diámetro pequeño de aproximadamente 3 mm por 0,5 mm de espesor. Esta punta 1104 es donde se deposita el oro sobre el vidrio óptico, y entra en contacto con la película lagrimal 1202 en cualquier parte del ojo 1204 (preferentemente la esclerótica), momentáneamente (Figura 12). Con referencia a la Figura 13, el ángulo de incidencia necesario para medir la osmolaridad lagrimal se mantiene mediante dos facetas que actúan como primeros espejos superficiales 1302, y que son parte del núcleo 1304 del mango 1102. Se muestra que el núcleo es una pieza sólida de material óptico con unas partes planas, rectificadas y pulidos para los espejos angulados 1302. Dado que la luz está en el medio denso (vidrio) antes de incidir sobre la superficie de detección, en esta configuración no se necesita prisma alguno, lo que simplifica y miniaturiza el sistema.

Dado que el recubrimiento metálico utilizado en SPR es tan delgado, no resulta muy duradero y no puede soportar limpiezas repetidas. Además, las superficies de detección se contaminan fácilmente y degradan la curva de SPR (agregan ruido). Y dado que este instrumento está destinado a su uso en la población general, en la medición de la osmolaridad lagrimal resulta deseable contar con una superficie de detección desechable a la que se preste este diseño. Esto se muestra en forma de una funda 1306 que sujeta el disco 1308 de superficie de detección, y después del uso se desecha todo el sistema (funda y disco).

El núcleo del sistema está alojado en una carcasa 1310 de montaje, que protege el núcleo y facilita el montaje de la funda. La carcasa trasera 1312 contiene el resto de los componentes para el sistema de SPR, y también aloja el botón 1106 para iniciar la medición. A través de un cable 1314 que sale desde la carcasa trasera se proporcionan energía y salida de señal, y la señal se procesa utilizando una unidad de procesamiento externa que contiene un microprocesador (o un ordenador).

En la figura 14 se muestran los componentes ópticos individuales que están alojados en la carcasa trasera. La luz de un diodo láser 1402 se colima mediante una lente colimadora 1404, y pasa a través de un filtro polarizador 1406. Una lente 1408 de focalización enfoca la luz para formar una línea 1410 sobre una superficie 1412 de detección, al reflejar la misma en un espejo integrado 1414 formado por la superficie del núcleo. La luz reflejada desde la superficie de detección diverge y se refleja en un espejo integrado 1416, y es colimada por una lente colimadora 1418. Un fotodiodo 1420 de elementos múltiples detecta la señal eléctrica de SPR que codifica un patrón de absorción de luz por parte de la superficie de detección. Se opera un ordenador o microprocesador para analizar la imagen del dispositivo sensor de luz, es decir, el fotodiodo.

El aparato de acuerdo con la invención detecta y mide una pluralidad de concentraciones de soluto de una muestra de lágrima, que incluyen naturalmente la concentración de al menos un soluto o analito antigénico, además de sal. Una superficie 108 de detección de oro transporta anticuerpos unidos a un analito antigénico de interés, que no sea un ion de sal, tal como una proteína u otra molécula compleja, una bacteria, un virus, un antígeno bacteriano o un antígeno viral. Adicionalmente, el ordenador 426 está programado para procesar periódicamente (por ejemplo, cada 1/30 de segundo) unas señales eléctricas que contienen datos de imágenes, para determinar una serie de líneas de absorción o ángulos de resonancia y para calcular diferencias angulares para aislar datos de líneas de absorción, pertenecientes a concentraciones de solutos que no sean iones de sal.

Así, además de comparar una posición de la línea de absorción o un ángulo de resonancia iniciales con una tabla de referencia o calibración, para determinar la concentración de sal de una muestra de lágrima, el ordenador 426 compara una posición de la línea de absorción o un ángulo de resonancia derivados con una tabla de referencia o calibración, para determinar la concentración de otro analito o soluto, tal como una proteína, en la muestra de lágrima. Esta última tabla contiene datos pregrabados que correlacionan la posición de la línea de absorción con la

concentración de un soluto o analito particular. La combinación de sal y otras concentraciones de analito facilita el diagnóstico de enfermedades o de potenciales enfermedades, que pueden ser puramente oculares o afectar a todo el cuerpo (diabetes, etc.).

5 El ordenador 426 ha almacenado en la memoria varias tablas de datos de ángulos de resonancia, siendo cada tabla perteneciente a un respectivo soluto que puede encontrarse en varias muestras de lágrima. Cada tabla incluye tabulaciones de ángulos de resonancia en función de la concentración de solutos. Por consiguiente, un único osmómetro de SPR para lágrimas puede medir múltiples concentraciones de soluto usando una serie de superficies 108 de detector que tengan diferentes anticuerpos unidos.

10 El fotodiodo 1001 o 1420 del aparato de SPR se opera para transmitir al ordenador 426 múltiples señales eléctricas por segundo, en el que cada una de las señales eléctricas codifica un patrón de absorción de la luz por parte de la superficie 108 de detección portadora de anticuerpos, estando separadas las señales eléctricas entre sí al menos por un intervalo de tiempo predeterminado. Adicionalmente, el ordenador o microprocesador 426 se opera para 15 analizar el patrón de absorción de la luz codificado en cada una de las señales eléctricas.

Al medir la osmolaridad de la lágrima con el dispositivo de SPR, se analiza la porción de la señal de SPR obtenida en los primeros milisegundos. Para una muestra dada de fluido lacrimonal, que contenga tanto solución salina como proteínas, la solución salina comprenderá moléculas o iones pequeños que migran rápidamente a la superficie de 20 detección. Las proteínas, al ser más voluminosas, tardan más en alcanzar la superficie de detección y unirse a la misma. Al realizar una medición basada en el tiempo en dos partes, se mide una primera señal que refleja la concentración de sal (osmolaridad) y una segunda señal, más amplia, que refleja la concentración de sal y de proteína a medida que la proteína se une a la superficie de detección. Se determina la concentración de la proteína a través de una sencilla sustracción de señales y de análisis (es decir, la señal mayor menos la señal menor es 25 proporcional a la concentración de proteína).

El ordenador 426 está programado para analizar los patrones de absorción de luz para determinar, por ejemplo, los ángulos de absorción máxima por parte de la superficie de detección (posiciones de la línea de absorción). Así, la operación del aparato de resonancia de plasmón superficial incluye más específicamente operar el ordenador 426 30 para determinar un ángulo de resonancia superficial o una posición de la línea de absorción, a partir de cada una de las señales eléctricas. Estos ángulos de resonancia o posiciones de la línea de absorción incluyen un primer ángulo de resonancia o posición de la línea de absorción asociado con una primera (temporalmente hablando) de las señales eléctricas (por ejemplo, 1/30 segundos después del contacto de la muestra de lágrima con la superficie 108 de detección), y un segundo ángulo de resonancia o posición de la línea de absorción asociado con una de las 35 señales eléctricas posteriores (por ejemplo, 2/30, 3/30, 4/30 segundos después del contacto de la muestra de lágrima con la superficie 108 de detección). El ordenador 426 compara entonces el primer ángulo de resonancia o posición de la línea de absorción con entradas de una primera tabla de calibración, para determinar un primer valor de concentración de solutos (osmolaridad), sustrae el primer ángulo de resonancia o posición de la línea de absorción y el segundo ángulo de resonancia o posición de la línea de absorción entre sí para determinar el ángulo 40 de resonancia o posición de la línea de absorción resultante, y compara el ángulo de resonancia resultante con las entradas de una segunda tabla de calibración para determinar una segunda concentración de soluto (por ejemplo, una proteína o antígeno).

La primera concentración de soluto es una concentración de sal. Esto se debe a que la sal migra más rápidamente a 45 la superficie de detección que los otros componentes de soluto de una muestra de lágrima. Concomitantemente, para obtener una posición de la línea de absorción o un ángulo de resonancia de la superficie de detección que corresponda solo a la concentración de sal de la muestra de lágrima, es necesario obtener una medición antes de una cantidad sustancial cualquiera de otro soluto (por ejemplo, proteínas, antígenos bacterianos) tenga la oportunidad de migrar a la superficie de detección. En esa situación, el desplazamiento de la línea de absorción o del ángulo de resonancia de la superficie de detección con respecto a la posición base (ángulo de refracción 50 determinado por el disolvente, el agua, y no por soluto alguno) se debe solo a la concentración de sal de la muestra de lágrima, y no a cualquier otra concentración de soluto. Un retardo de no más de 1/30 de segundo desde el momento de la deposición de la muestra de lágrima, sobre la superficie de detección, será generalmente lo suficientemente rápido como para que la señal de video inicial capture la concentración de sal con poco error, o sin error alguno, debido a concentraciones de otras sustancias. Cuando la sonda de medición entra en contacto con la 55 superficie de un ojo para obtener una muestra de lágrima, esta primera señal, así como varias mediciones posteriores, se llevan a cabo inevitablemente mientras la sonda todavía está en contacto con el ojo.

Antígenos Químicos para la Detección de Enfermedades

60 La técnica general de uso de la SPR como sensor de antígenos químicos es la siguiente. Primero es necesario identificar un anticuerpo que se enlace específicamente con el antígeno químico deseado. Una vez identificado, se enlaza el anticuerpo específico a la superficie de detección a través de técnicas químicas húmedas. El enlace de anticuerpos a superficies de detección de SPR es bien conocido y, aunque existen diversas metodologías, a 65 continuación se describe un método.

Se introduce una muestra de lágrima sobre la superficie 108 de detección que porta los anticuerpos enlazados y, si la muestra de lágrima contiene el antígeno químico deseado, se observa un cambio en la señal de SPR (un cambio del ángulo en el que se produce el fenómeno). Si la muestra de lágrima no contiene un antígeno químico, la señal no se verá alterada. A continuación se muestra un resumen de la vinculación del anticuerpo y la detección del antígeno químico.

5

Inmovilización del Anticuerpo

El anticuerpo puede enlazarse a la superficie 108 de detección de oro usando técnicas químicas con tiol bien conocidas. La molécula de tiol actúa como una capa adhesiva entre el anticuerpo y el oro. La unidad de tiol quimisorbe el oro y se adhiere al mismo mientras que el otro extremo, que tiene un grupo amino o un grupo de ácido carboxílico, reacciona con uno de los grupos ácido carboxílico o amino terminales, respectivamente, fijando así el anticuerpo. Algunos ejemplos de adhesivo tiol podrían ser ácido 11-tioundecanoico o hidrocloreuro de 2-aminoetanotiol. Las Figuras 16 y 17 muestran un esquema usando este último. Sin embargo, cualquiera de los dos es igualmente efectivo y su uso se registrará por la disponibilidad del sitio reactivo terminal en el anticuerpo específico en cuestión.

10

15

Se produce una superficie 108 de detección de SPR como se describió anteriormente, depositando una capa de oro de 50 nm de espesor sobre vidrio, con una capa subyacente apropiada (es decir, 2 nm de cromo) para una buena adhesión del oro. Antes de la vinculación del anticuerpo, primero se hace fluir la solución de hidrocloreuro de 2-aminoetanotiol sobre la superficie del sensor de oro usando una celda de flujo con un orificio de entrada, una cámara de retención, un orificio de salida y una bomba, como se describió anteriormente. El sistema de celda de flujo permite que diversos fluidos entren en contacto con la superficie de detección de manera conveniente. Hacer pasar la solución de hidrocloreuro de 2-aminoetanotiol sobre la superficie de detección tiene como resultado la formación de una monocapa autoensamblada (SAM). Posteriormente, se hace fluir una mezcla del anticuerpo y de EDC sobre esta SAM usando el mismo aparato de celda de flujo. Los grupos amino de la SAM reaccionarán con el grupo de ácido carboxílico terminal en el anticuerpo, dando como resultado la fijación del anticuerpo a la superficie de oro. En la Figura 17 se muestra el mecanismo de reacción. La Figura 16 muestra la estructura química de los diferentes componentes químicos involucrados en la reacción. En las Figuras, R1, R2 y R3 son representaciones abreviadas de las regiones de la molécula que no forman parte de la reacción. Es una práctica común utilizar estas abreviaturas para describir los mecanismos de reacción en estudios.

20

25

30

Después de este proceso la superficie 108 de detección porta un anticuerpo inmovilizado específico, y está lista para la detección de antígenos químicos. Se instala entonces la superficie 108 de detección en el instrumento (por ejemplo, en el diseño de sonda mostrado en las Figuras 11 y 13 se instala la superficie 1104 y 1308 de detección sobre la punta del núcleo 1310 de vidrio), y luego se pone en contacto con una muestra de lágrima. Dependiendo del anticuerpo presente, se producirá una vinculación preferencial específica para el respectivo antígeno, lo que conlleva una señal de SPR.

35

Ya pueden proporcionarse más detalles sobre patologías específicas a detectar, monitorear y/o estadificar mediante la creación de anticuerpos para antígenos químicos específicos, que pueden enlazarse con la superficie de detección de oro.

40

Inflamación en las Lágrimas

45

La detección y monitorización de la inflamación en las lágrimas resultan útiles para diagnosticar y clasificar la blefaritis, el ojo seco y la alergia ocular.

Pueden usarse anticuerpos para citoquinas y quimioquinas proinflamatorias para medir dichas citoquinas y quimioquinas con SPR, incluyendo, pero sin limitación, factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 1-beta (IL-1-beta), IL-11, IL-4, IL-4, IL-6, interleucina-6 receptor soluble (IL-6sR), IL-7, eotaxina-2, proteína 1 macrofágica inflamatoria (MIP-1alfa), MIP-1beta, monoquina inducida por interferón (MIG)-gamma, y proteína inducible por interferón-gamma (IP)-10.

50

Mucosa

55

En el ojo seco existe una pérdida de mucinas específicas de la superficie del ojo. Por ejemplo, en el ojo seco se da una disminución de MUC 5a.

60

Pueden usarse anticuerpos contra MUC 1, 4, 5a, 16 para medir estas mucinas con tecnología de SPR.

Enfermedad Ocular Alérgica

La conjuntivitis alérgica es una reacción de hipersensibilidad de tipo I que comienza cuando un alérgeno, tal como el polen, estimula la síntesis de anticuerpos IgE específicos para alérgenos. Los anticuerpos IgA aumentan con la enfermedad ocular alérgica vernal. Pueden crearse anticuerpos IgE e IgA, y estos anticuerpos pueden medirse

65

utilizando la tecnología de SPR.

Infecciones Bacterianas

- 5 Pueden diagnosticarse y clasificarse infecciones bacterianas por medio de la sonda de SPR para lágrimas, lo que permite, por ejemplo, diferenciar entre infecciones gram negativas y gram positivas.

Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo contra antígenos O específicos de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos gram negativos con tecnología de SPR, para identificar infecciones gram negativas. También pueden crearse anticuerpos para reconocer especies individuales de bacterias tales como, pero sin limitación, pseudomonas, Proteus mirabilis y Staphylococcus aureus.

Infecciones Virales

- 15 Puede resultar difícil diagnosticar y diferenciar el herpes simple y el herpes zoster. Pueden crearse anticuerpos específicos para estos y otros virus con fines de diagnóstico, que pueden usarse con la tecnología de SPR.

Infecciones por Hongos

- 20 Resulta difícil diagnosticar infecciones fúngicas. Se han creado anticuerpos para organismos fúngicos específicos tales como, pero sin limitación, Aspergillus, Blastomyces Coccidioides e Histoplasma.

Infecciones por Chlamydia y Acanthameoba

- 25 Pueden generarse anticuerpos contra Chlamydia y Acanthameoba, para diagnosticar estas infecciones en la película lagrimal utilizando la tecnología de SPR.

Operación Práctica del Dispositivo

- 30 Para detectar proteínas en el fluido lagrimal no es necesario modificar ninguno de los dispositivos físicos del dispositivo descrito anteriormente, con referencia a las Figuras 1-15. Las proteínas migrarán a la superficie de detección de oro y se fijarán a la misma, para permitir la detección de concentraciones a través de técnicas de SPR. Para detectar proteínas, el software es tal como se analizó anteriormente. Para medir concentraciones de antígenos químicos (que no sean proteínas) para la detección de enfermedades, es necesario que la superficie 108 de detección contenga anticuerpos fijados. El ordenador 426 incluye programación, tal como se describió anteriormente. La superficie 108 de detección de oro porta anticuerpos fijados a un analito antigénico de interés, tal como una molécula compleja, una bacteria o un virus. Adicionalmente, el ordenador 426 está programado para procesar periódicamente (por ejemplo, cada 1/30 de segundo) señales eléctricas que contienen datos de imagen, para determinar una serie de líneas de absorción o ángulos de resonancia y para calcular diferencias en los ángulos para aislar datos de líneas de absorción, pertenecientes a concentraciones de solutos que no sean iones de sal.

45 Durante la detección de proteínas y analitos antigénicos, el software (o la electrónica de detección de señales, es decir el microprocesador) capta la señal generada durante un período de tiempo. Por ejemplo, cuando se pone la superficie de detección en contacto con la muestra de lágrima, se captura la señal en el instante en que la superficie de detección entra en contacto con la muestra. A continuación, se captura una señal cada 1/30 de segundo, por ejemplo en una cámara de video estándar, durante varios segundos. El primer fotograma de video representa la señal relacionada con la osmolaridad de la lágrima. A medida que las proteínas comienzan a enlazarse con la superficie de detección, o cuando el analito antigénico comienza a enlazarse con los anticuerpos en la superficie de detección, la señal cambiará y el software analizará los fotogramas sucesivos obtenidos posteriormente, para determinar la concentración de proteínas u otra concentración de analitos antigénicos. Para cada antígeno químico específico a identificar, se proporciona una superficie de detección con el anticuerpo requerido, ligado a la superficie para la detección de la señal.

55 En el instrumento de sonda descrito en el presente documento con referencia a las Figuras 11-13, la pequeña punta de la superficie de detección se ha ligado con el anticuerpo específico. El resto del hardware descrito con referencia a las Figuras 1-15 no cambia respecto a la configuración descrita. Dado que el material huésped sigue siendo lágrimas humanas, el intervalo angular nominal al que se produce la SPR no cambia, por lo que no es necesario ajuste alguno del ángulo de incidencia del haz láser. La detección de la señal aún se produce usando un detector de elementos múltiples.

60 Nuevamente, el software requiere ciertas modificaciones. Dado que, para la osmolaridad o las mediciones de concentración de sal, el software analiza la señal de SPR adquirida, para una osmolaridad dada se determina el ángulo de la señal de SPR y se compara este valor con la tabla de calibración almacenada en el ordenador.

65 Para detectar antígenos químicos que utilicen anticuerpos específicos ligados a la superficie de detección, el software deberá ser "consciente" de que va a efectuarse una medición diferente a la de la osmolaridad. El usuario

adquiere la punta de superficie de detección para anticuerpo específico en forma de dispositivo comercial, la aplica al instrumento y pone la muestra de lágrima en contacto con la superficie de detección. Si el antígeno químico está presente, la señal de SPR mostrará un cambio y el software analizará la señal de SPR para determinar el grado de cambio.

5

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de diagnóstico médico que comprende un aparato de resonancia de plasmón superficial, que tiene una superficie (108) de detección a poner en contacto con una muestra de lágrima del ojo de un paciente, y que
5 tiene adicionalmente un dispositivo sensor de luz y un ordenador o microprocesador (426), conectado operativamente a dicho dispositivo sensor de luz para recibir desde el mismo una señal eléctrica que codifica un patrón de absorción de la luz por parte de dicha superficie (108) de detección, estando adaptado dicho dispositivo sensor de luz para transmitir a dicho ordenador o microprocesador (426) múltiples señales eléctricas por segundo con una separación temporal uniforme, codificando cada una de dichas señales eléctricas un patrón de absorción de
10 la luz por parte de dicha superficie (108) de detección, estando dichas señales eléctricas separadas temporalmente entre sí, **caracterizado por que** dicho ordenador o microprocesador (426) está programado para determinar una concentración de sal y una concentración de un analito o antígeno soluto, en la muestra de lágrima que está en contacto con dicha superficie de detección, mediante el direccionamiento exclusivo de una luz con longitud de onda única hacia dicha superficie de detección, y mediante la medición de múltiples ángulos de resonancia o posiciones de la línea de absorción de la luz de longitud de onda única reflejada en dicha superficie de detección, en diferentes momentos, teniendo dicha superficie de detección anticuerpos apropiados para detectar dicho antígeno de analito o soluto, incluyendo los ángulos de resonancia o las posiciones de la línea de absorción un primer ángulo de resonancia o posición de la línea de absorción asociado con dicha luz de longitud de onda única, y codificado en una primera (temporalmente hablando) de dichas señales eléctricas, y un segundo ángulo de resonancia o posición de la
15 línea de absorción asociado con dicha luz de longitud de onda única, y codificado en una posterior señal de dichas señales eléctricas, calculándose al menos una concentración de la muestra de lágrima al sustraer una señal anterior de una señal posterior, junto con el uso de tablas de calibración.
2. El sistema definido en la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo sensor de luz es una cámara y dicha señal eléctrica es una señal de video.
3. El sistema definido en la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo de detección de luz es un fotodiodo (1420) de elementos múltiples y dicha señal eléctrica es una señal de diferencia analógica.
- 30 4. El sistema definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho ordenador o microprocesador (426) está programado para comparar una posición de la línea de absorción con datos pregrabados y correlacionar la posición de la línea de absorción con una concentración de soluto.
- 35 5. El sistema definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho aparato de resonancia de plasmón superficial incluye una carcasa manual portátil con una punta operativa, adaptada para facilitar el contacto de una superficie (108) de detección situada en dicha punta operativa con una porción del ojo del paciente.
- 40 6. El sistema definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho aparato de resonancia de plasmón superficial tiene la forma de una sonda portátil y dicha superficie (108) de detección comprende una funda que soporta una película metálica, dispuesta en una posición predeterminada sobre una punta operativa de la sonda.
- 45 7. El sistema definido en la reivindicación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha superficie (108) de detección incluye una primera capa de un primer metal, dispuesta sobre una segunda capa de un segundo metal.
- 50 8. El sistema definido en la reivindicación 7, en el que dicha segunda capa está a su vez dispuesta sobre un sustrato de un material transparente.
9. Uso del sistema definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para determinar, ex vivo, concentraciones de una sal y un antígeno de analito o de soluto en una muestra de lágrima.
10. Un método de ensayo ex vivo, que comprende:
- 55 proporcionar un aparato de resonancia de plasmón superficial que incluye un dispositivo sensor de luz y un ordenador o microprocesador (426), unido operativamente a dicho dispositivo sensor de luz;
proporcionar en dicho aparato de resonancia de plasmón superficial una superficie (108) de detección; y
colocar una muestra de lágrima obtenida de un ojo de un paciente en contacto con dicha superficie (108) de
60 detección, **caracterizado por que** el método comprende operar el aparato de resonancia de plasmón superficial para determinar concentraciones de una pluralidad de solutos en la muestra de lágrima, y dirigir exclusivamente una luz de longitud de onda única a un lado de dicha superficie de detección, opuesto a la muestra de lágrima, teniendo dicha superficie de detección anticuerpos adecuados para detectar un antígeno de analito o de soluto;
incluyendo la operación del aparato de resonancia de plasmón superficial operar dicho dispositivo sensor de luz para transmitir a dicho ordenador (426) múltiples señales eléctricas, por segundo y con una separación temporal
65 uniforme, codificando cada una de dichas señales eléctricas un patrón de absorción de la luz por parte de dicha superficie (108) de detección en función del ángulo de reflexión de dicha luz de longitud de onda única, estando

dichas señales eléctricas separadas temporalmente entre sí,
incluyendo la operación del aparato de resonancia de plasmón superficial adicionalmente operar dicho ordenador
o microprocesador (426) para determinar un ángulo de resonancia superficial o una posición de la línea de
absorción de dicha luz de longitud de onda única a partir de cada una de una pluralidad de dichas señales
5 eléctricas, incluyendo los ángulos de resonancia o absorción o las posiciones de la línea de absorción un primer
ángulo de resonancia o posición de la línea de absorción asociado con una primera señal (temporalmente
hablando) de dichas señales eléctricas, y un segundo ángulo de resonancia o posición de la línea de absorción
asociado con una posterior señal de dichas señales eléctricas, calculándose al menos una concentración de la
muestra de lágrima al sustraer una señal anterior de una señal posterior, junto con el uso de tablas de
10 calibración,

en el que la operación del aparato de resonancia de plasmón superficial incluye adicionalmente operar dicho
ordenador o microprocesador (426) para comparar dicho primer ángulo de resonancia o posición de la línea de
absorción con entradas de una primera tabla de calibración, para determinar un primer valor de concentración de
solutos; sustraer dicho primer ángulo de resonancia o posición de la línea de absorción y dicho segundo ángulo
15 de resonancia o posición de la línea de absorción entre sí, para determinar un ángulo de resonancia o posición
de la línea de absorción resultante; y comparar dicho ángulo de resonancia resultante con entradas de una
segunda tabla de calibración para determinar una segunda concentración de solutos, en el que la primera
concentración de solutos es una concentración de sal y la segunda concentración de solutos es una
concentración de dicho antígeno de analito o de soluto.
20

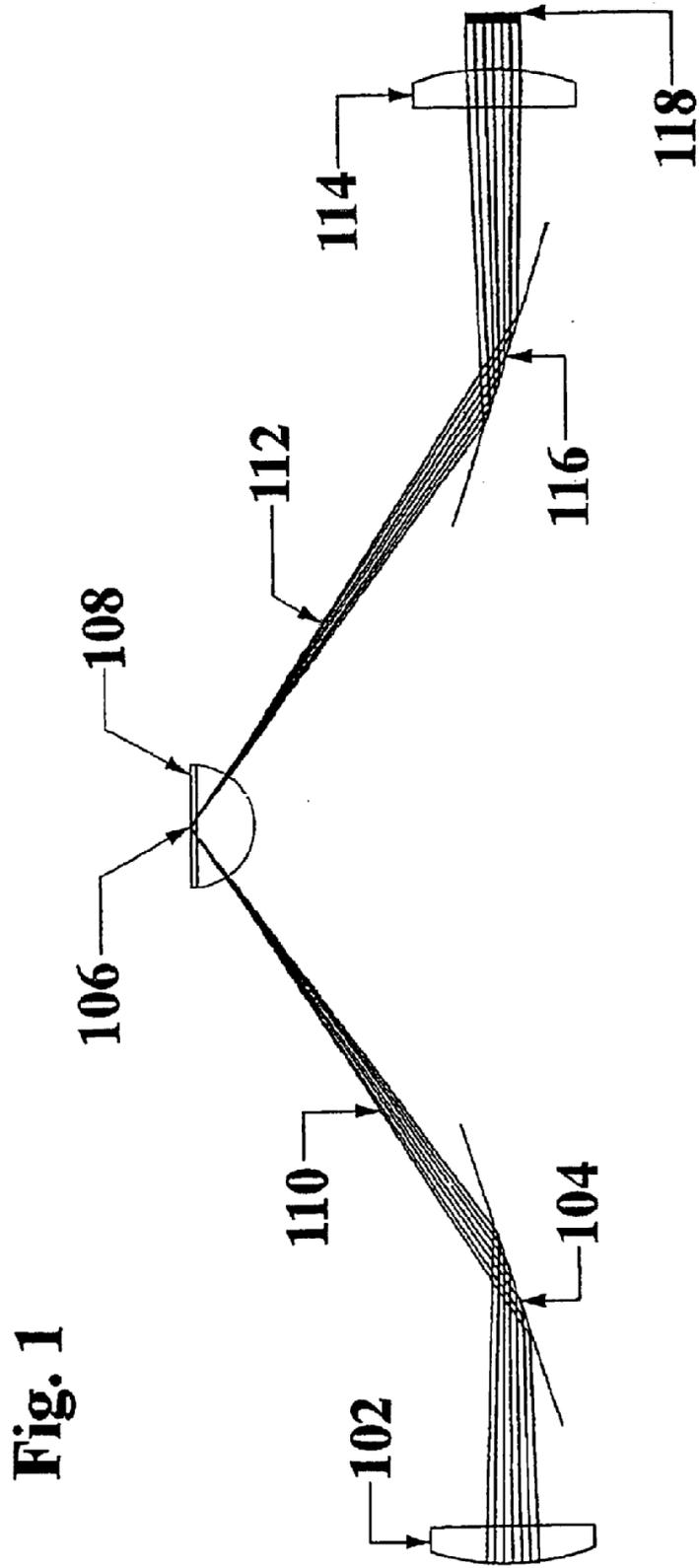


Fig. 1

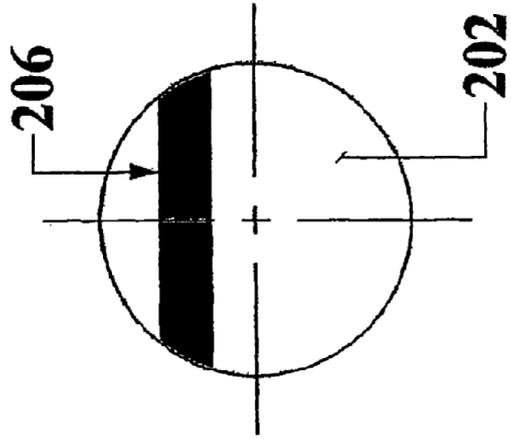


Fig 2C

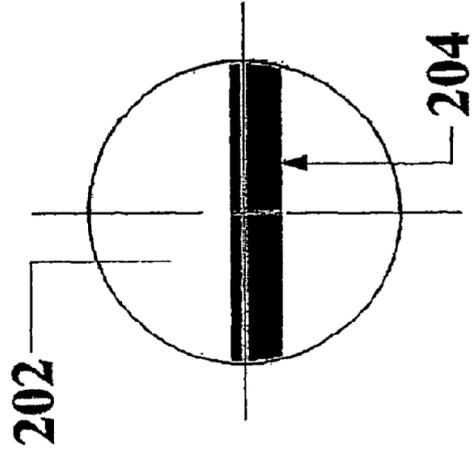


Fig 2B

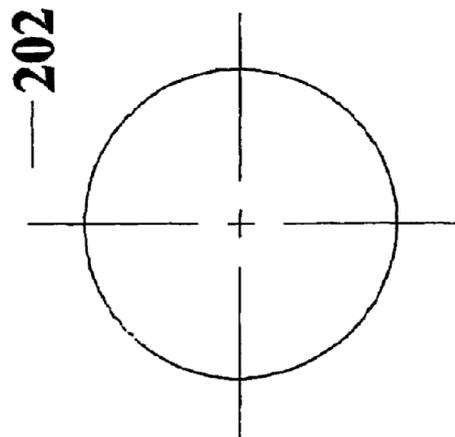


Fig 2A

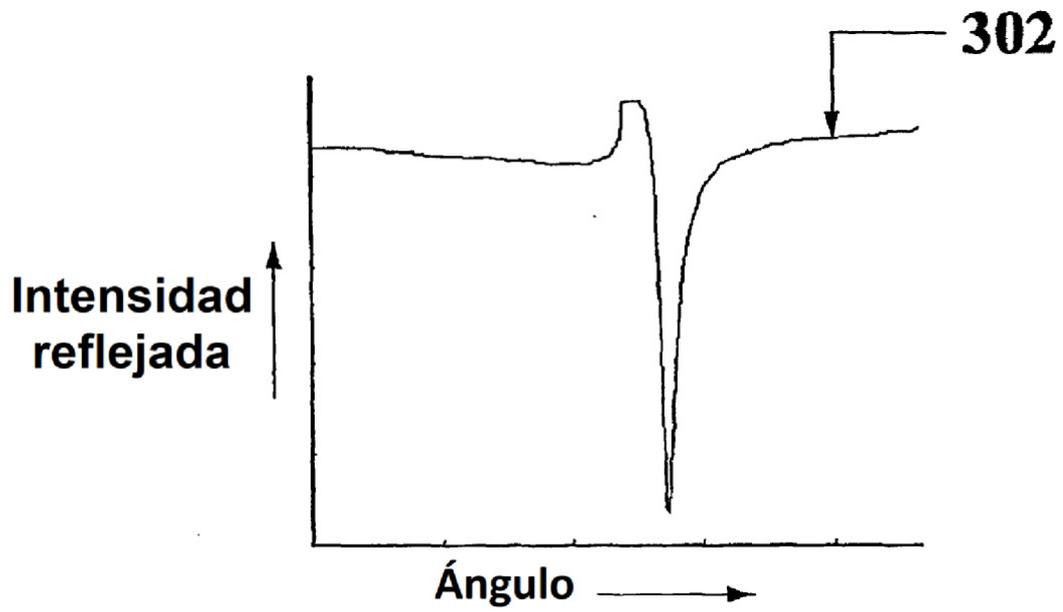


Fig. 3A

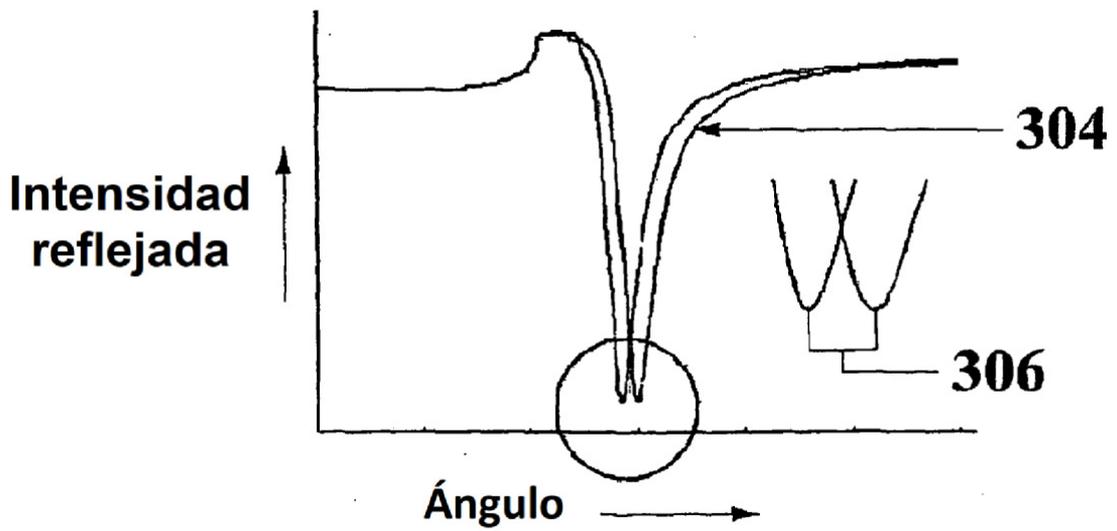


Fig. 3B

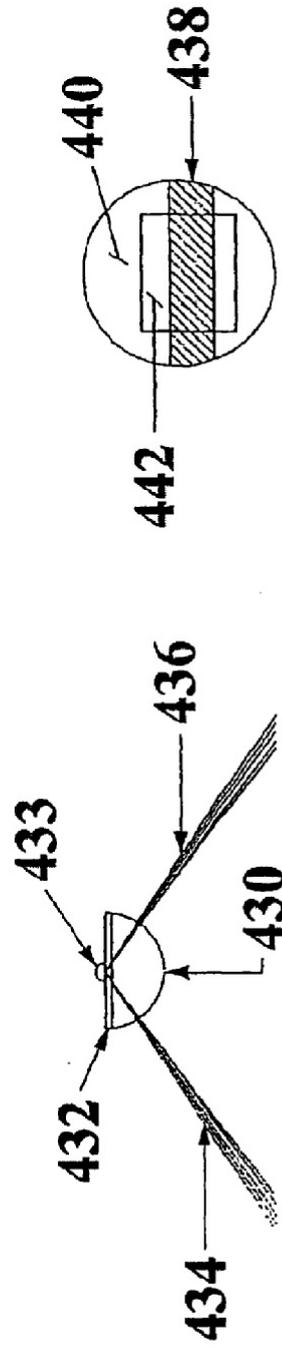
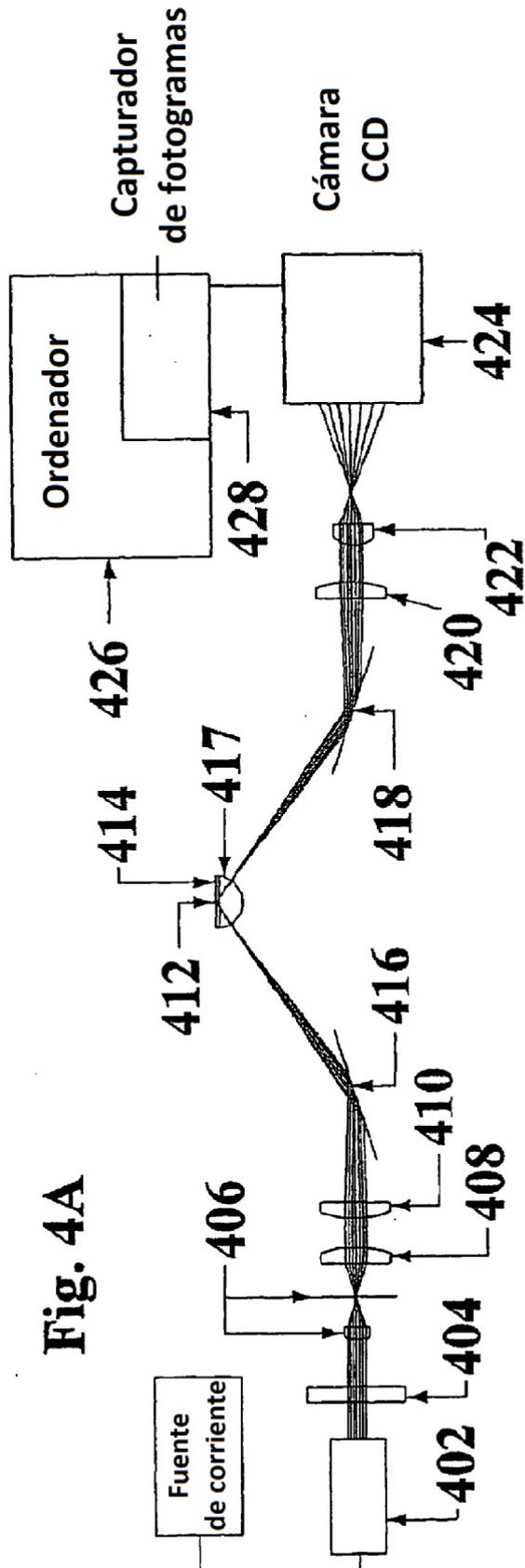
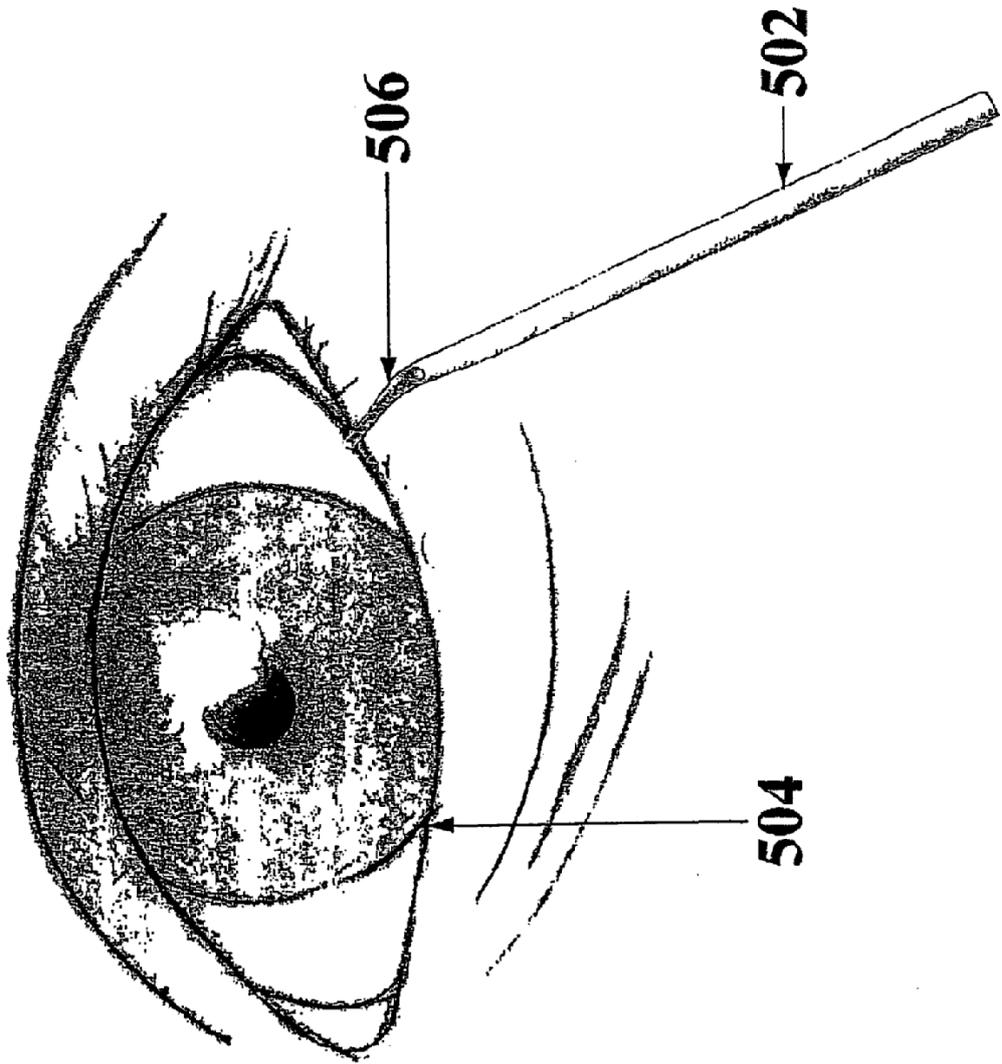


Fig. 4C

Fig. 4B

Fig. 5



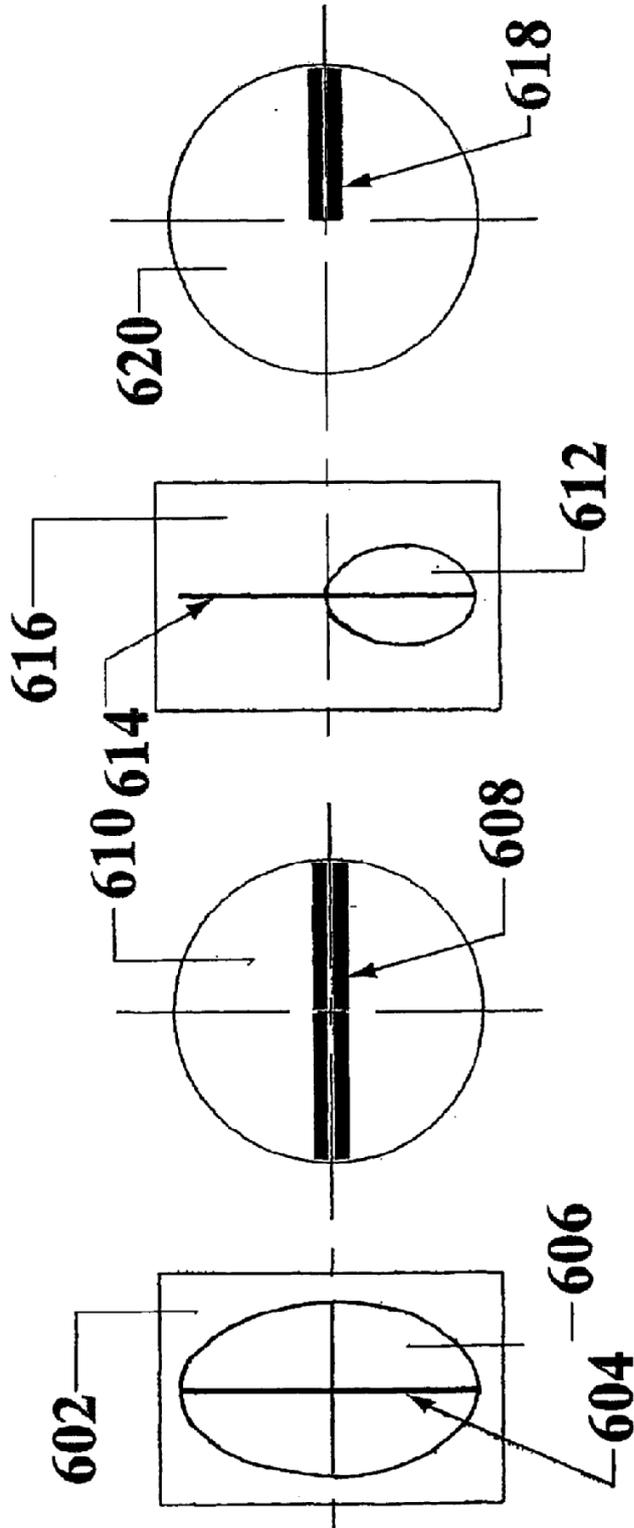


Fig. 6A Fig. 6B Fig. 6C Fig. 6D

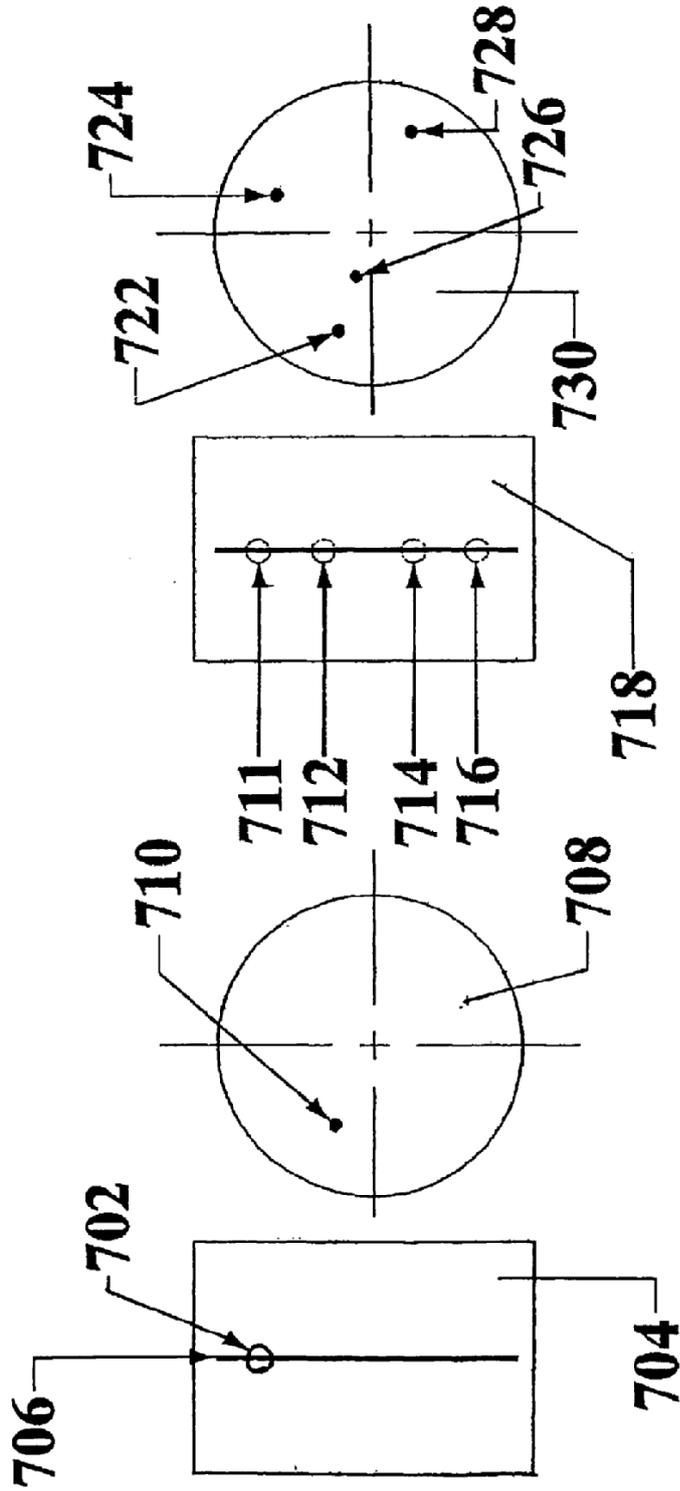


Fig. 7D

Fig. 7C

Fig 7B

Fig. 7A

Fig. 8A

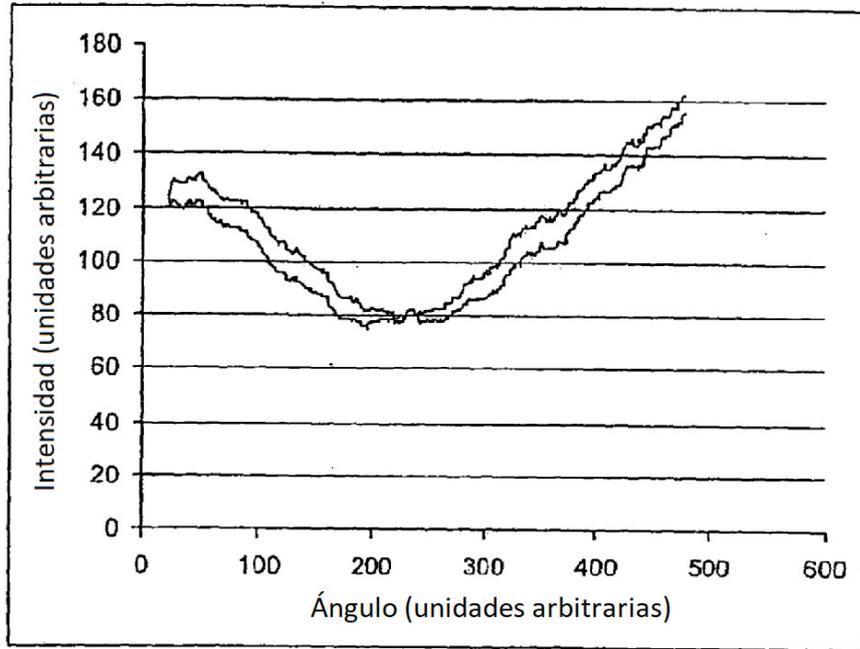


Fig. 8B

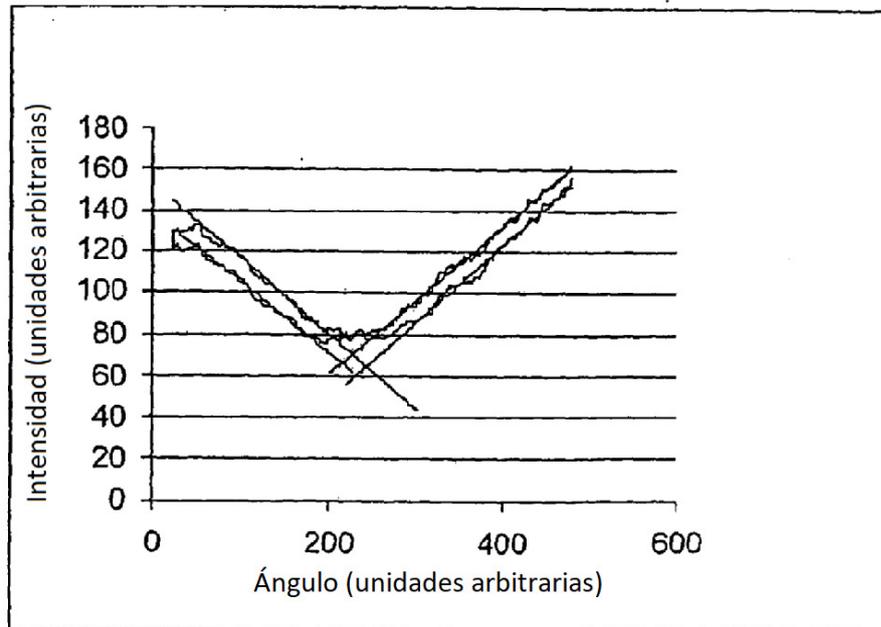


Fig 9a

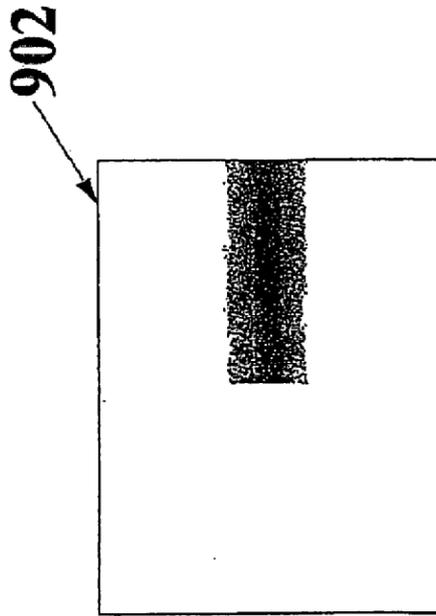


Fig. 9b

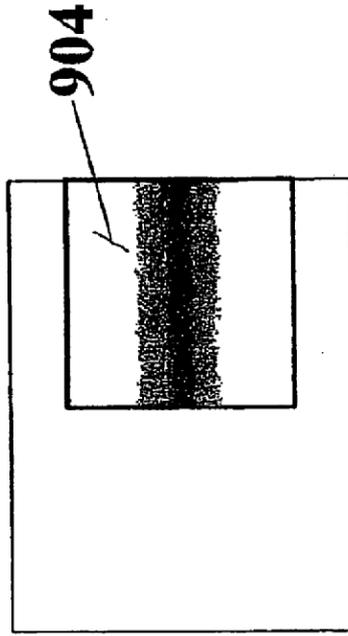
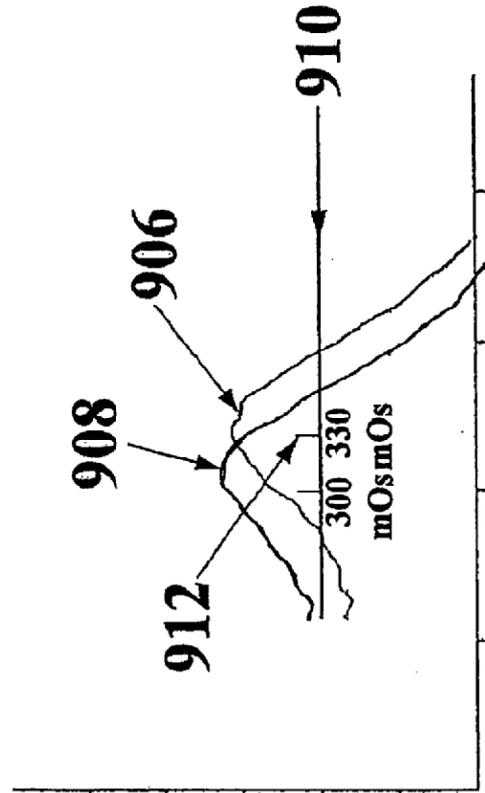


Fig. 9c



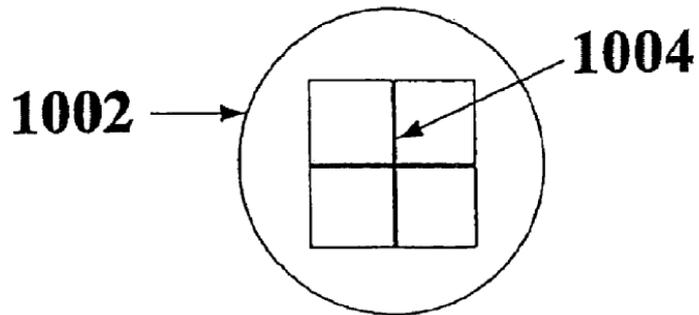


FIGURA 10A

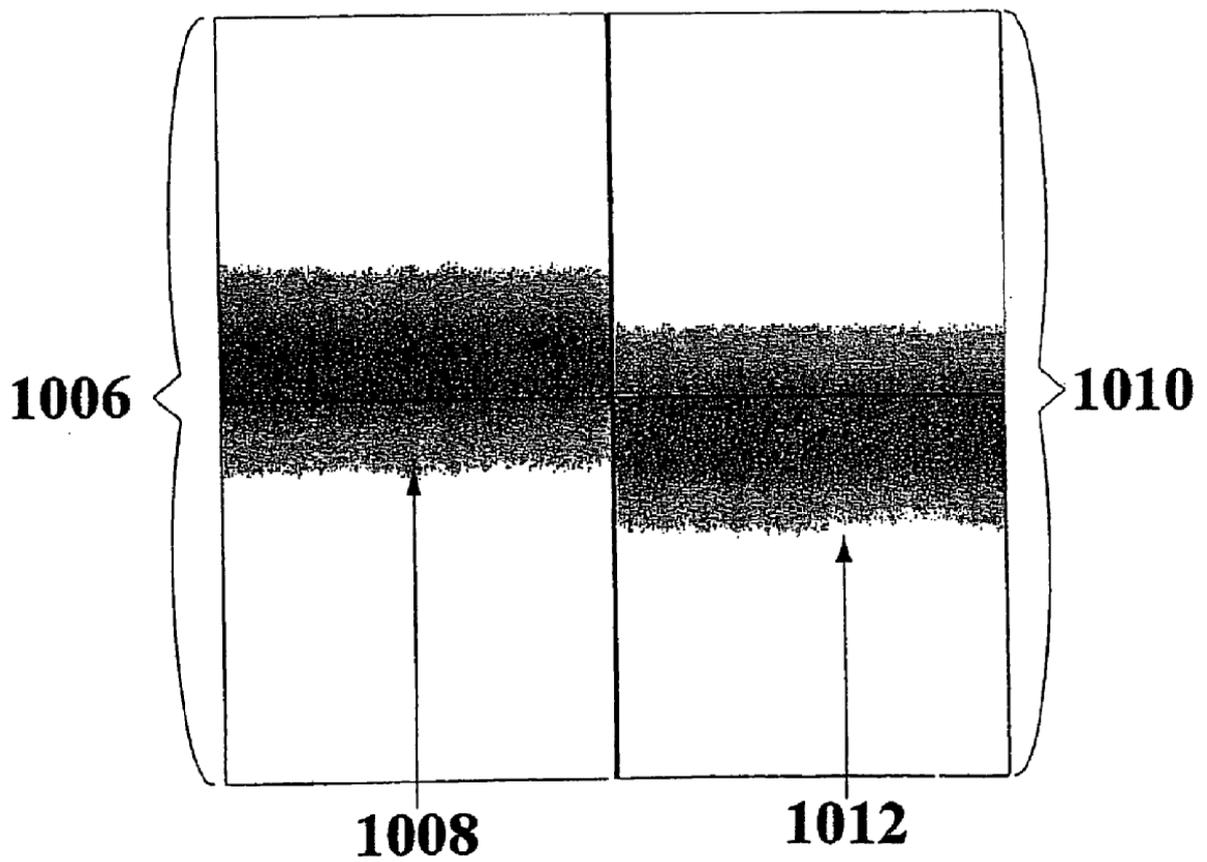


FIGURA 10B

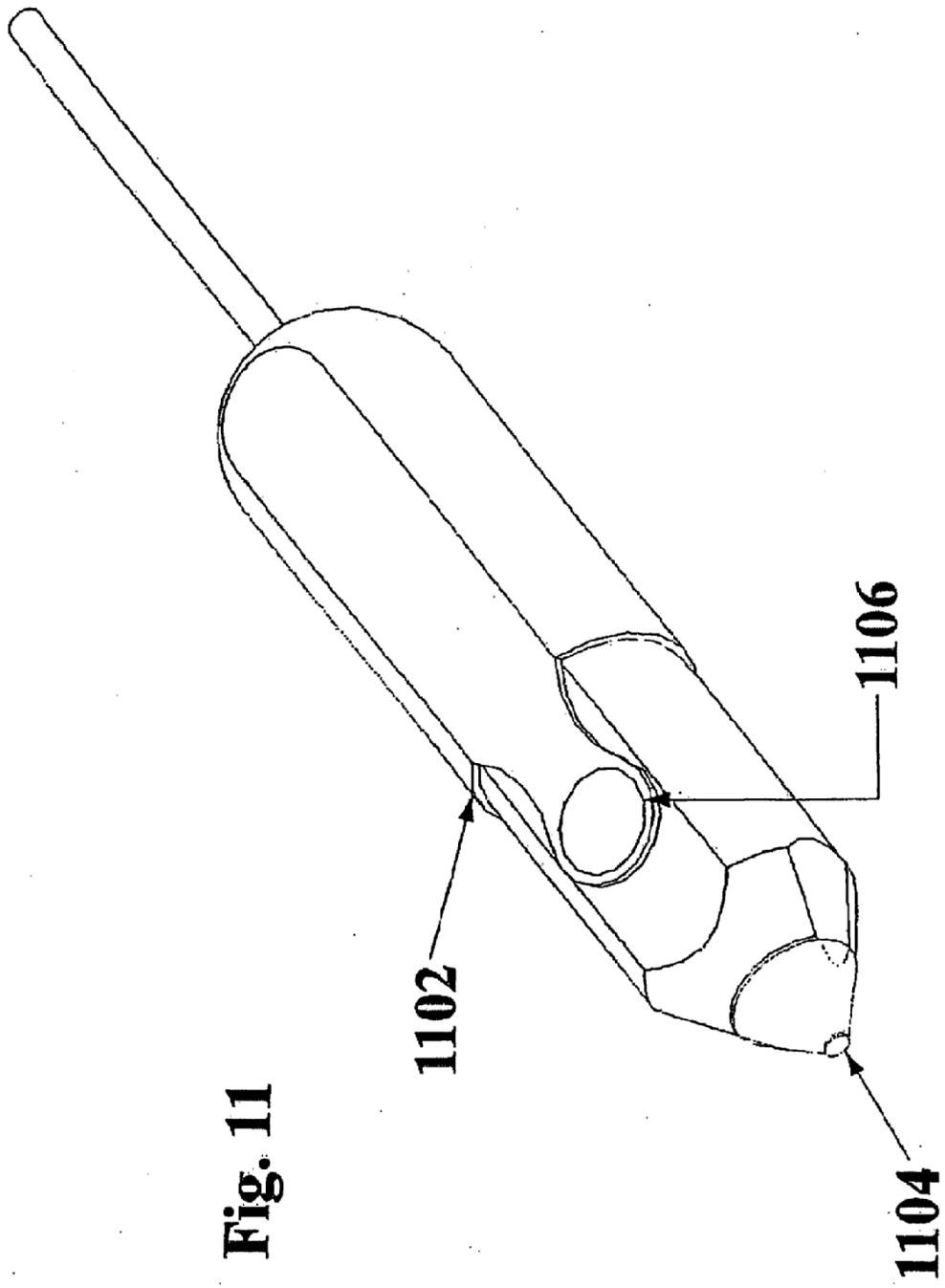
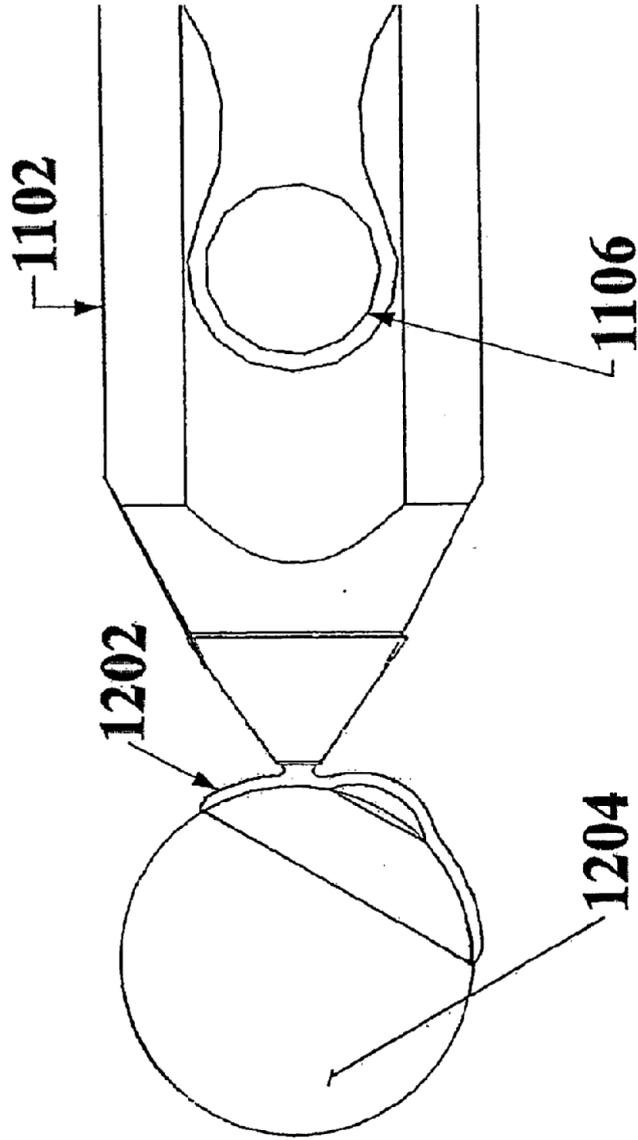


Fig. 11

Fig. 12



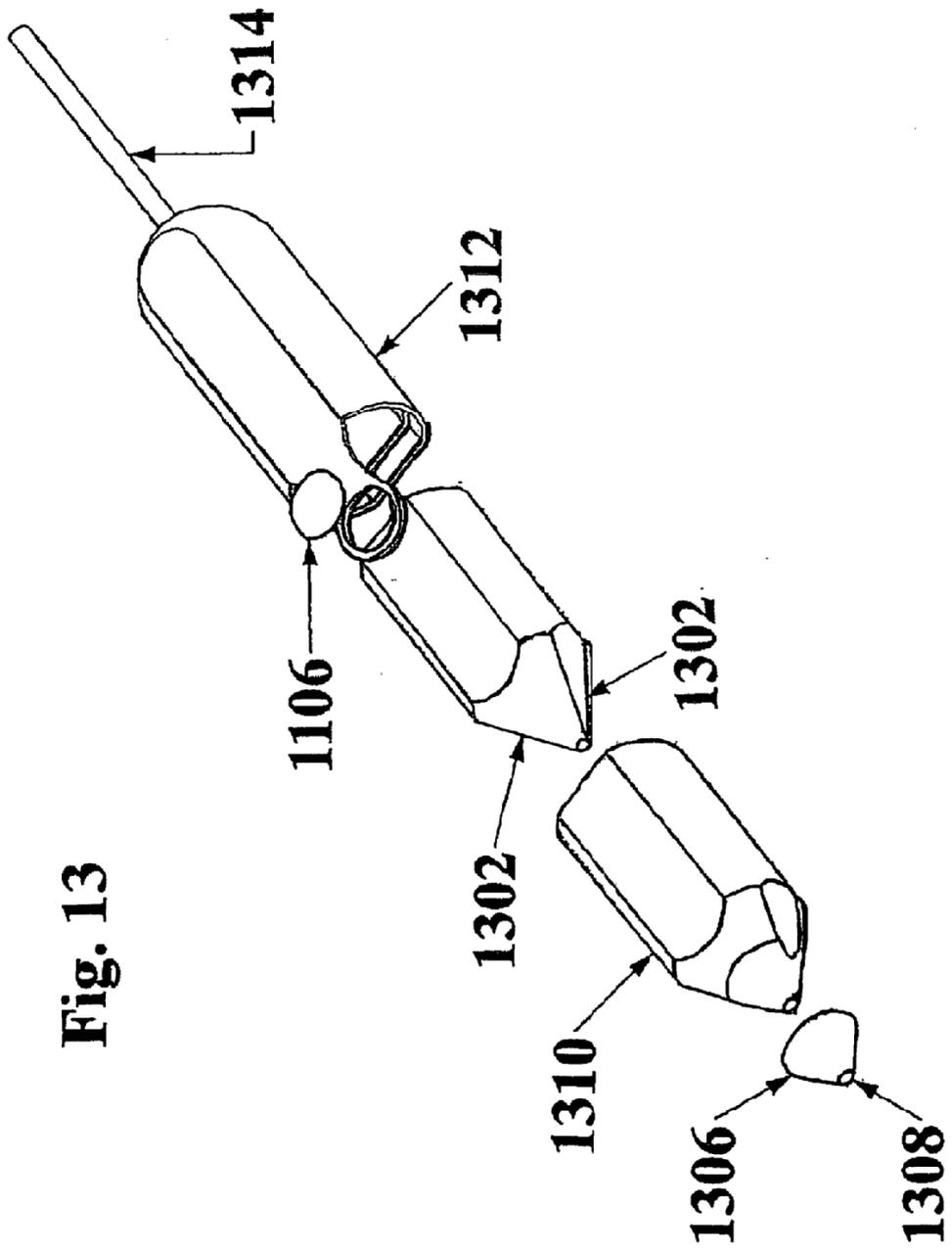


Fig. 13

Fig. 14

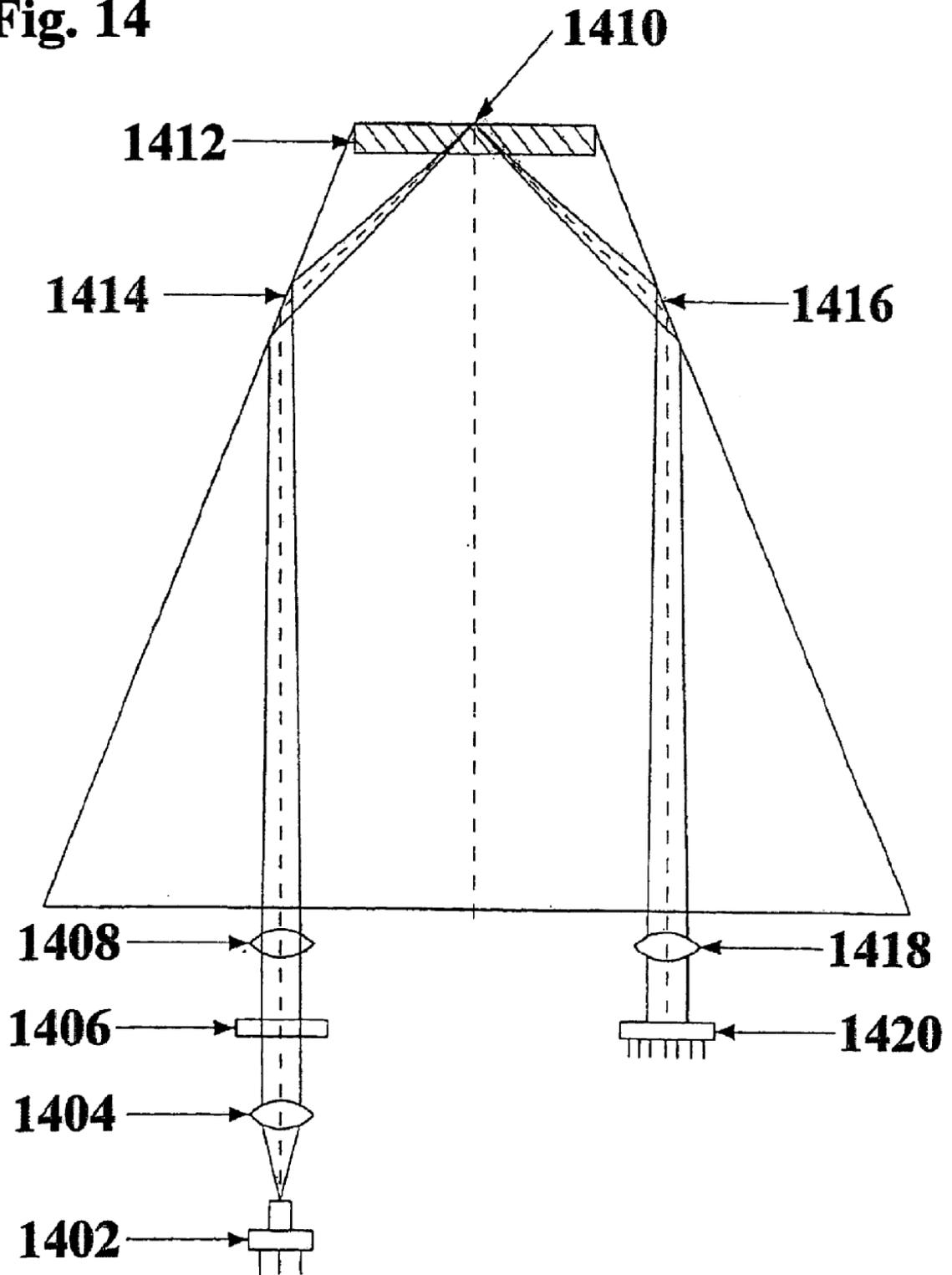
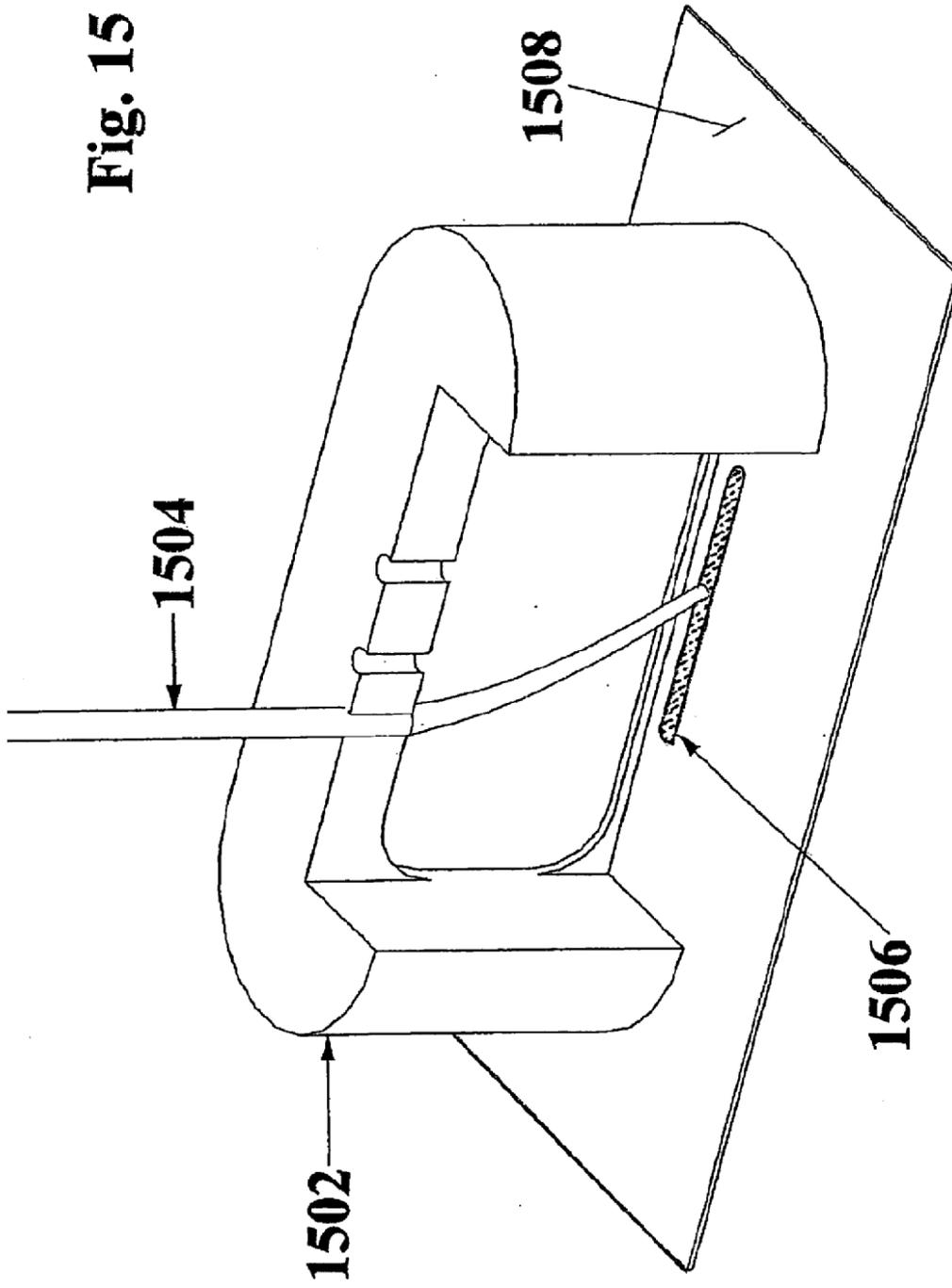


Fig. 15



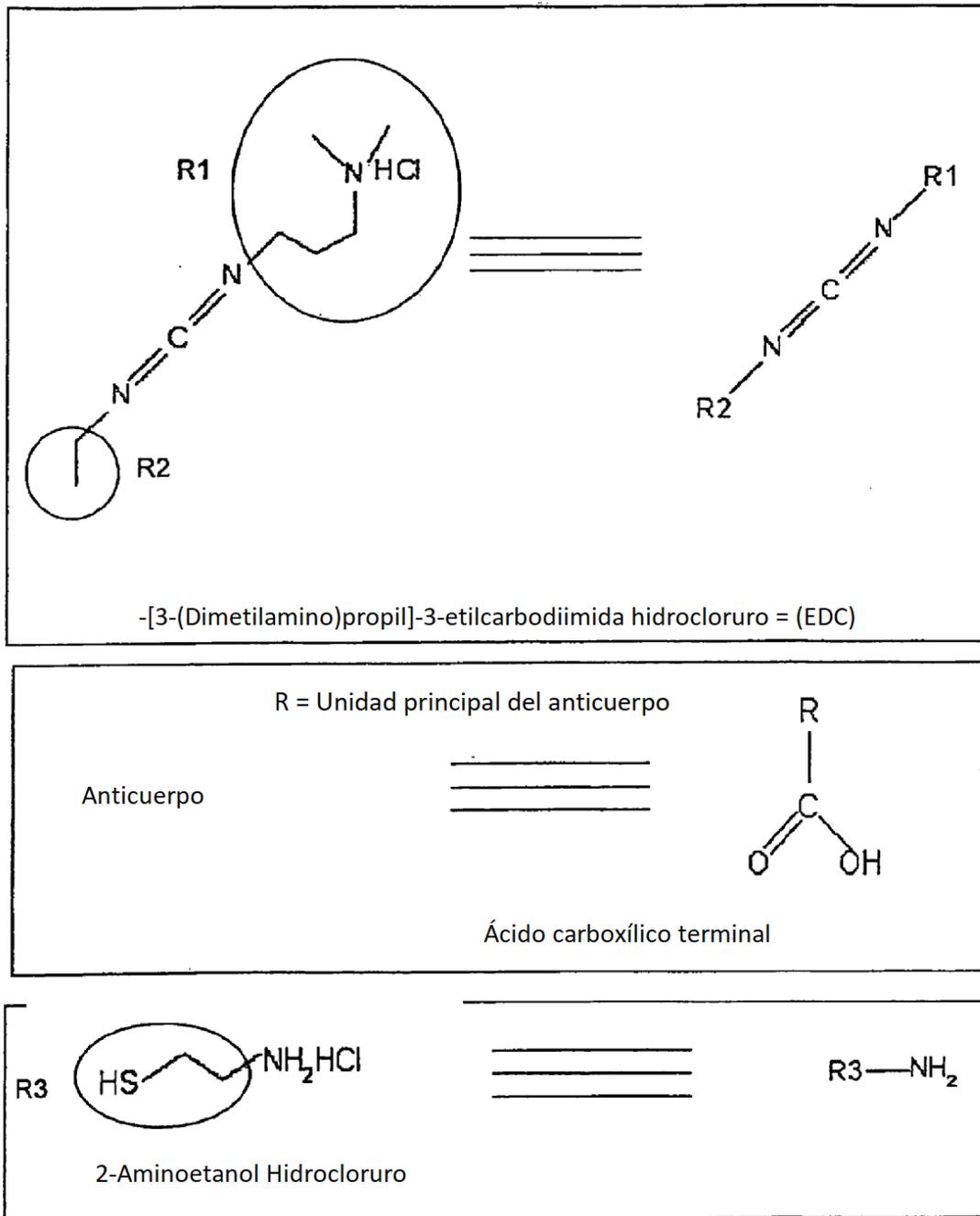


Fig. 16

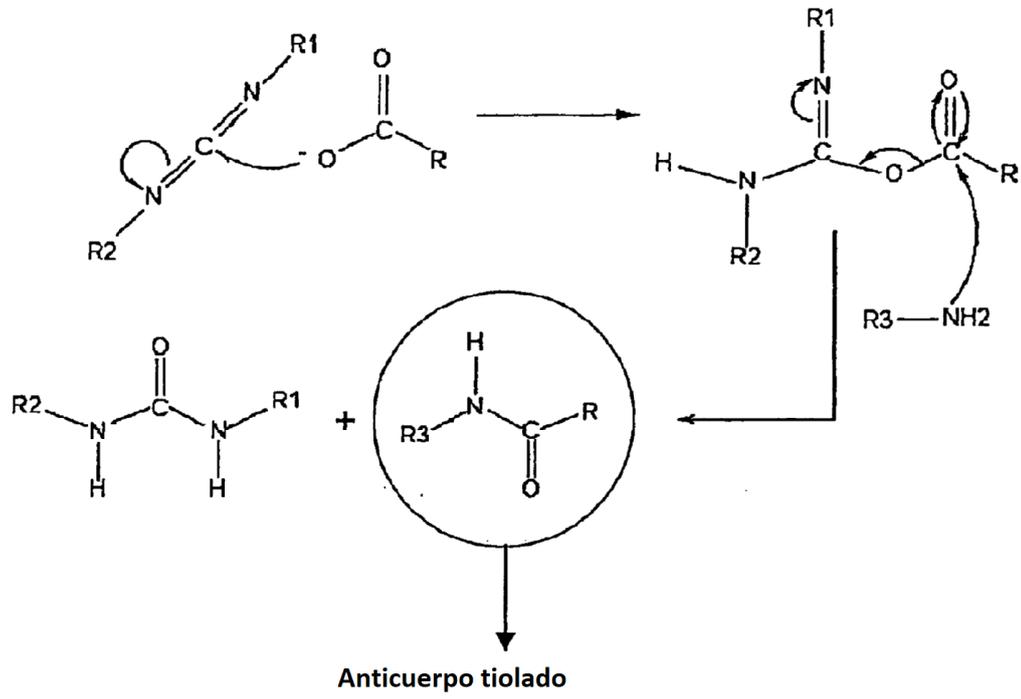


Fig. 17