



ESPAÑA

19 ES	11	NUMERO	A1
	21	- 444.659	
	22	FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

20 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
545.066	29.1.1975	ESTADOS UNIDOS
545.069	29.1.1975	ESTADOS UNIDOS
600.593	31.7.1975	ESTADOS UNIDOS
600.787	31.1.1975	ESTADOS UNIDOS

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

64 TITULO DE LA INVENCION APARATO PARA LA DISCRIMINACION DE ELEMENTOS EXTRAÑOS EN ENSAYOS OPTICOS
--

71 SOLICITANTE (S) BAXTER LABORATORIES INC.
--

DOMICILIO DEL SOLICITANTE Deerfield/Illinois 60015 (Estados Unidos)
--

72 INVENTOR (ES) D. Eugene Kenneth Achter, D. Jerome Carl Kremen, D. Rodolfo Ramirez Rodriguez y D. Paolo Priarone
--

73 TITULAR (ES) BAXTER LABORATORIES INC.
---

74 REPRESENTANTE VICTOR GIL VEGA
-------------------------------------



Breve resumen de la invención

Esta invención se relaciona con el uso de la nefelometría para determinar por ensayo la cantidad de complejo inmunoquímico presente en una muestra.

5                   La invención se basa en el hecho de que en un ensayo de complejo inmunoquímico los diversos ingredientes presentes tienen distintos tamaños. Las partículas, incluyendo macromoléculas disueltas, presentes en el neutralizador, anticuerpo y suero son mucho menores que las partículas de complejo inmunoquímico, aunque las partículas fortuitas de polvo son generalmente mucho mayores. Como resultado de esta diferencia de tamaño y de la diferencia entre la gran concentración de neutralizador, anticuerpo y suero presentes y la pequeña concentración de polvo presente, sucede que la dispersión debida a las partículas de polvo fluctúa, mientras que la dispersión debida a todos los demás componentes es razonablemente firme.

10

15

El propio nefelómetro se caracteriza por los siguientes aspectos.

20                   El sistema óptico emplea una disposición que acepta muestras en tubos de ensayo y mide con precisión la dispersión de avance de un pequeño volumen de líquido, espaciado dentro de las paredes del tubo de ensayo. El diseño del sistema óptico es tal que la reflexión especular del haz incidente sobre las paredes del tubo de ensayo no obstaculiza la medición de la dispersión, por lo que los tubos de ensayo comerciales son satisfactorios para su uso como células de ensayo.

25

El ángulo de la dispersión de avance se selecciona de modo que sea aproximadamente de 30° respecto al

30



5 haz iluminador dentro de dicho pequeño volumen, pues se ha comprobado que, para una amplia gama de ángulos centra- dos en ese valor, la relación entre la dispersión deseada, producida por las partículas interesantes del complejo in-  
munoquímico, y la dispersión, no interesante, producida por las partículas mayores y menores presentes en el ensa-  
yo, es considerablemente mayor que con otros ángulos de dispersión.

10 La dispersión debida a grandes partículas, tales como las de polvo, es irregular e ignorada por el sistema circuital electrónico, que mide el valor mínimo de la señal de dispersión durante un período de tiempo.

15 El valor de la dispersión debida a partícu- las inferiores a las interesantes es sustraído de la dis-  
persión total para determinar la magnitud de la dispersión producida por las partículas interesantes. Esta sustracción la realiza semiautomáticamente el instrumento, de acuerdo con las lecturas efectuadas sobre las soluciones patrones o "en blanco" de las partículas inferiores a las que inte-  
20 resan.

Más adelante figuran las instrucciones para la realización del ensayo.

#### Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 es una vista en sección vertical tomada a través de la porción óptica de un nefelómetro per- feccionado para inmunoensayos construído de acuerdo con la presente invención.

30 La figura 2 es una vista en sección horizon- tal ampliada, tomada sensiblemente por la línea 2-2 de la

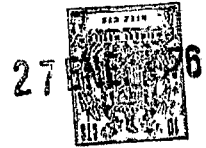


figura 1.

La figura 3 es una vista en sección vertical fragmentaria y ampliada de la porción foto-dispersora del nefelómetro de la figura 1.

5 La figura 4 es un diagrama en perspectiva, correspondiente a la figura 3, que ilustra cómo el campo fotomultiplicador de observación es limitado por diafragmas de campo para permitirle la observación de la dispersión de avance de solamente una porción limitada de la muestra situada dentro del tubo de ensayo.

10 La figura 5 es un diagrama simplificado en bloques del sistema circuitual de procesamiento y control de señales eléctricas del nefelómetro.

15 La figura 6 es un diagrama en bloques de otra versión de sistema de ensayo por nefelometría de complejos inmunoquímicos.

20 La figura 7 es un diagrama de las secciones de medición y control eléctrico del nefelómetro, mostrando la relación de las partes con los controles del panel frontal.

La figura 8 es una vista en perspectiva de una versión preferida del nefelómetro, mostrando los controles e indicadores del panel frontal y la estación de ensayo óptico; y

25 Las figuras 9A y 9B son esquemas del circuito usado en el nefelómetro de la figura 8.

#### Antecedentes de la invención

30 En un laboratorio biológico, la nefelometría constituye un auxiliar ordinario para medir cuantitativa-



mente la cantidad de ciertos elementos biológicos presentes en una muestra líquida. La medición se efectúa dirigiendo un haz de luz a través del líquido y determinando la cantidad de luz que se dispersa a diferentes ángulos. La cantidad dispersada depende del tamaño de las partículas dispersoras, su concentración, su forma, la longitud de onda de la luz usada, los índices de refracción de las partículas y del medio en que están suspendidas y el ángulo con que se mide la dispersión. Existe un amplio campo de conocimientos que permite realizar una determinación de la concentración a partir de tales observaciones, si se conoce la distribución de los tamaños de partícula, pero existen también dificultades prácticas.

Por ejemplo, en el caso particular que condujo a la presente invención, se deseaba medir la cantidad de un complejo inmunoquímico en una muestra.

Partiendo de ensayos de filtración efectuados para determinar el tamaño aproximado de las partículas que daban lugar a las señales de dispersión deseadas e indeseadas, respectivamente, se determinó que el complejo inmunoquímico deseado pasaba a través de un filtro de 0,4 micras, pero quedaba detenido por un filtro de 0,2 micras. Su tamaño era por consiguiente, grosso modo, de unos 300 nanómetros.

El ángulo seleccionado para la medición de la luz dispersada influye grandemente en la magnitud de la medición. Un pequeño ángulo de avance incrementa la cantidad de luz dispersada, como es evidente cuando se considera el aspecto de las luces en la noche a través de la niebla. Además, las partículas de tamaños mayores y medios

27 ENL. 

son relativamente más efectivas en cuanto a dispersión de la luz con pequeños ángulos de avance que las partículas pequeñas. Así, para reducir al mínimo la contribución de partículas de pequeño tamaño, son deseables unos ángulos de avance pequeños. Sin embargo, también se obtiene una fuerte dispersión a partir de las grandes partículas de polvo inevitablemente presentes en las muestras. Así, para reducir al mínimo la contribución de partículas de gran tamaño, deberán emplearse mayores ángulos de dispersión de avance.

En la realización de la medición, la invención se atiene al hecho de que las partículas que interesan son las de mayor tamaño de entre las presentes de manera macroscópica constante. Las partículas mayores, concretamente las de polvo, evolucionan en la solución y su dispersión no es constante, porque tales partículas de polvo, relativamente escasas desde un punto de vista estadístico, no son constantes en el campo de un haz de luz.

En consecuencia, la invención mide el deseado componente sustrayendo del valor observado la contribución constante de partículas inferiores a las de interés mientras suprime eléctricamente la contribución fluctuante del polvo, de manera que no se incluya en la medición.

Se ha comprobado que existe una amplia gama de ángulos de avance de dispersión, centrados aproximadamente en  $30^\circ$ , en la que el ángulo seleccionado incrementa la relación entre la dispersión por partículas de tamaños medios y grandes y la dispersión por partículas de tamaño pequeño, sin incrementar también la dispersión producida por partículas de tamaño grande en una medida tal que se



sobrecargue la capacidad del sistema eléctrico para suprimir el componente fluctuante que representa a las partículas de tamaño grande.

Descripción detallada

5

Con referencia a los dibujos, el número 11 designa en su conjunto la porción óptica de un nefelómetro de acuerdo con la presente invención. El nefelómetro 11 comprende un alojamiento 12 en el que se monta adecuadamente una unidad laser horizontalmente dirigida 13, por ejemplo una unidad laser Modelo 155, fabricada por Spectrophysics, de Mountain View (California, EE.UU.), que genera un haz laser de 632,8 nm (nanómetros), mostrado en 14.

10

15

El alojamiento 12 está provisto de una cámara vertical 15 receptora de la muestra, dotada de una pared lateral recta 16 relativamente gruesa, como se ve en la figura 1, paredes anterior y posterior 17 y 18, una pared lateral izquierda 19 y una pared inferior 20. La cámara 15 está provista de una cubierta superior desmontable 21 que tiene un reborde periférico 22.

20

25

La pared lateral derecha 16 presenta una muesca vertical 23 en V orientada hacia el interior, adaptada para su acoplamiento a un tubo de ensayo convencional 24 verticalmente colocado. Un bloque presionador vertical 25 dotado igualmente de una muesca vertical 26 en V dirigida hacia dentro, está deslizablemente situado en la cámara lateral izquierda 15, según se ve en la figura 1, y está provisto de un par de resortes de alambre verticales y arqueados 27, 27, simétricamente asegurados a la cara la-

30

27 ENF 1974



5 teral izquierda del bloque, para apoyarse contra la pared 19 de la cámara y obligar al bloque 25 con ranura en V a ejercer una fuerza elástica contra el tubo de ensayo 24, para mantenerlo firmemente contra la muesca 23 en V de la pared 16, tal como se muestra en la figura 2.

10 La pared 19 y el bloque 25 están dotados de sendas aberturas 28 y 29 para el rayo laser, alineadas con el haz o rayo 14. La pared 16 presenta un hueco verticalmente extendido 30, que incluye una cavidad 31 para trampa de luz, alineada con el rayo 14 y revestida de material fotoabsorbente adecuado. El hueco 30 comunica con un paso de luz 32, inclinado en  $45^\circ$  y formado en la pared 16, que lleva en sus extremos opuestos unos diafragmas colimadores de campo 33 y 34 que tienen diafragmas de campo redondos, con una divergencia de  $2,8^\circ$ , tal como anteriormente se describe, alineados a  $45^\circ$  con respecto al rayo 14 y dirigidos, para un tubo de ensayo convencional 24 de 12 x 75 mm, a un punto de la pared de dicho tubo situado aproximadamente a 3,07 mm por encima de la línea central del rayo.

15 El diafragma de campo 34 se abre en un tubo de luz 35 que conduce a un tubo fotomultiplicador 36 montado en una cámara 37, dispuesta para ello en el alojamiento 12, tal como se muestra en la figura 1.

25 En algunos nefelómetros convencionales que utilizan tubos de ensayo como células de ensayo, el rayo incidente y la dispersión observada se encuentran en un plano perpendicular al eje del tubo de ensayo. En tal disposición, los rayos incidentes son múltiplemente reflejados desde los dos lados del tubo de ensayo en el mismo pla

30

27 FEB 1970



no que la dispersión observada y son captados sin discriminación. Uno de los aspectos característicos del presente nefelómetro es la colocación del eje del tubo de ensayo en el mismo plano que el de los rayos incidente y dispersado, evitando así la señal falsa debida a múltiples reflexiones desde los lados del tubo de ensayo. Estas señales falsas no son iguales con diferentes tubos de ensayo. Las citadas reflexiones múltiples son las existentes en la interfase vidrio-aire y se dan en ausencia de imperfecciones, pero son ampliamente diferentes con distintos tubos de ensayo, debido al gran número de reflexiones implicadas.

Como puede verse por la figura 4, el rayo la ser ilumina intensamente una sección del tubo de ensayo 24 y su contenido entre la entrada 24A y la salida 24D. En estos dos puntos, los inevitables depósitos superficiales y elementos extraños ordinariamente presentes en el vidrio o plástico de los tubos de ensayo o cubetas de laboratorio, o sobre ellos, y las irregularidades de la interfase tubo-líquido y tubo-aire, causan una fuerte dispersión de avances, que no guarda relación con la dispersión de avance que se desea medir. Para eliminar esta indeseada dispersión de avance de la medición, los diafragmas de campo 33 y 34 cooperan para definir una familia de rayos extremos, dos de los cuales, 63A y 63B, se muestran. Estos dos rayos extremos se encuentran en un plano vertical que contiene el diámetro vertical de cada uno de los diafragmas de campo 33 y 34. Estos dos rayos extremos, que se muestran refractándose en la superficie posterior del tubo de ensayo, definen una parte de los límites anterior y posterior de ob-



servación 24B y 24C. La porción del volumen del tubo de ensayo comprendida entre esos dos límites de observación y también iluminada por el rayo laser, es accesible a la observación por el tubo fotomultiplicador 36. Este tubo  
5 tiene una abertura de entrada 36B, que es mayor que la abertura de salida 36A de los diafragmas de campo 33 y 34, y que rodea dicha abertura de salida.

Estos diafragmas de campo están montados verticalmente y por consiguiente definen un campo de ob  
10 servación cuya sección recta es elíptica más bien que redonda. Esto es cuestión de conveniencia en el uso de diafragmas de campo redondos y montajes verticales.

Aunque la porción realmente usada del tubo 24 aparece en la figura 4 extendiéndose casi desde una a otra pared interna del tubo, la ilustración está exagerada para hacer visibles los detalles. En nuestras versiones preferidas, hemos usado una porción efectiva de 1 mm aproximadamente en su dimensión mayor, junto al centro de un tubo de ensayo de 10 mm de diámetro. Esta desproporción  
15 de tamaños incrementa la precisión de la medición.

Con 38 (figuras 1 y 2) se designa una placa obturadora de seguridad, que se acopla deslizadamente contra la pared izquierda 19 y que tiene un reborde inferior 39 a través del cual se desliza un pasador vertical 40 do  
25 tado de cabeza y rígidamente asegurado a la pared inferior del alojamiento 12. Un resorte impulsor helicoidal 41 rodea la porción inferior del pasador 40 y se apoya entre el reborde 39 y la pared inferior del alojamiento. El extremo superior de la placa 38 se extiende a través de una  
30 ranura-guía 42 dispuesta en la pared superior del aloja-



miento 12 y situada debajo del reborde periférico 22 de la cubierta superior 21. La placa obturadora 38 tiene una ligera abertura 43 que se desplaza hasta su coincidencia con la abertura 28 de la pared cuando se asienta la cubierta superior 21 en posición cerrada sobre el extremo superior de la cámara 15, tal como se muestra en la figura 1. Cuando se retira la cubierta 21, el resorte 41 eleva la placa obturadora 38 a la posición de cierre, cubriendo la abertura 28. Esto asegura contra peligros de centelleo del laser, que pueden existir cuando un operador mira hacia abajo al tubo de ensayo 24 con la cubierta 21 retirada.

Tal como se explica anteriormente, y según se muestra en las figuras 3 y 4, se produce una refracción en la pared del tubo de ensayo 24, de manera que el ángulo de salida del rayo dispersado, mostrado en 63, es de 45° respecto al rayo laser incidente 14, mientras que dentro del tubo de ensayo el ángulo de dispersión es de 31,6° respecto al rayo laser incidente. El ángulo de 45° es un ángulo conveniente de fabricación y el consecuente ángulo de 31,6° ha resultado producir una elevada relación entre la dispersión por partículas del complejo inmunoquímico y la dispersión por partículas menores, sin sobrecargar el circuito de procesamiento eléctrico (que se explicará luego) con excesivas señales de ruido fluctuantes, derivadas de la presencia de partículas grandes, tales como las de polvo. Se verá también que el rayo dispersado angulado visto por el tubo fotomultiplicador 36 está en un plano vertical que contiene al eje del tubo de ensayo, eliminando así elementos extraños debidos a reflexiones internas en tal tubo de ensayo, según se explica anteriormente.



Tubos de ensayo satisfactorios para su empleo con la invención son los existentes en el mercado. Por ejemplo, los tubos Kimble ordinarios, de 10 x 75 mm, son satisfactorios, salvo si presentan defectos en la pared, que se evidencian con una breve inspección visual.

5

En la práctica, unas partículas de un tamaño aproximado de 0,3 micras en el líquido del tubo de ensayo 24 dispersan fuertemente el rayo laser 14 a lo largo de la trayectoria óptica definida por los diafragmas de campo 33 y 34 y generan las correspondientes señales en el tubo fotomultiplicador 36, de manera que estas señales pueden usarse para medir la cantidad de antígeno originalmente presente en el tubo de ensayo, después de añadirse una cantidad conocida de material anticuerpo al líquido contenido en dicho tubo.

10

15

A bajos niveles de antígeno y ángulos de dispersión de avance relativamente pequeños, tales como el ángulo aquí empleado (aproximadamente  $31,6^\circ$ ), la influencia de las partículas de polvo y de análogos elementos extraños existentes en el tubo de ensayo resulta muy importante y se presenta una fuente de grave error. El dibujo de la figura 5 ilustra en forma de bloques un circuito manipulador de señales que discrimina contra esporádicos efectos de máximos positivos causados por tales partículas de polvo u otros elementos extraños. Se trata de un circuito procesador de señales, que corta cotas positivas en la señal de salida del fotomultiplicador, de manera que tales cotas positivas nunca son enviadas al equipo medidor y procesadas por él. Estas cotas positivas son generadas por las partículas de polvo presentes en el líquido objeto

20

25

30

27 ENE 1979



de examen o por los otros elementos extraños antes mencionados. Así, debido a las partículas de polvo, por ejemplo, la señal fotométrica generada en el tubo fotomultiplicador 36 es variable, con grandes cotas positivas 71 causadas por las partículas de polvo individuales. La señal variable del fotomultiplicador se aplica en 47 a una entrada de un inversor 44A y del sumador 44B. Un firme voltaje escalonado superior a la señal máxima del fotomultiplicador se aplica en 45 a la otra entrada del inversor 44A y del sumador 44B. La señal de entrada en 47 es invertida en el inversor 44A, como se muestra en 72, mostrándose en 73 las cotas invertidas. El firme voltaje positivo de entrada aplicado en 45 se suma en el sumador 44B a la señal 72 y la resultante señal positiva de salida en 46, mostrada en 74, tiene cotas positivas correspondientes a los valores mínimos originales 75 de la señal de entrada aplicada en 47.

La señal de salida en 46 pasa a través de un elemento conmutador cronometrador 76, un conmutador electrónico 48, un diodo 49 y un amplificador operacional 50, proporcionando una señal de salida en 52 en forma de cota positivo cuando la entrada variable en 47 es un mínimo. La mayor señal máxima positiva durante el período de muestreo que llega al amplificador operacional 50 se retiene en el capacitor 77 para desarrollar una firme señal de comparación, obtenible en 52, que se aplica en 78 a una entrada de un comparador 53. La señal de salida 74 del dispositivo 44 se aplica (con el elemento conmutador cronometrado 76 en posición cerrada) a la otra entrada 79 del comparador 53. El conmutador 48 se cerrará inicialmente al valor inicial de la curva 74. El capacitor 77 se cargará a este



valor, en cuyo punto se abrirá el conmutador 48 mediante la acción del comparador 53. El valor existente en 52 se mantendrá hasta que la amplitud de la curva 74 exceda del valor inicial almacenado con punto más elevado en 52, en cuyo punto se cerrará de nuevo el conmutador 48. El valor existente en 52 seguirá (incrementará) ahora asintóticamente los valores máximos positivos, relativamente estables, de la curva 74, proporcionando un nuevo valor almacenado en 52. La curva 74 continuará estableciendo tales nuevos valores almacenados (con cada incremento). El comparador ignora los efectos de los mínimos causados por elementos extraños (tales como los mínimos 80). En cualquier momento en que la amplitud de la curva 74 descienda por debajo del valor almacenado en 52, se abre el conmutador 48 y la señal existente en 46 se envía entonces al capacitor integrador 77 para su almacenamiento. Tampoco puede perderse la señal positiva almacenada en el capacitor 77, a menos que se cierre el conmutador de reajuste 88. Estas señales positivas no pueden perderse a través del diodo 49 cuando la señal en la salida 46 es más negativa (como en 80) que el valor almacenado en el capacitor integrador 77, debido a la polarización del diodo 49, que permite el flujo de cargas positivas solamente de izquierda a derecha. Las señales positivas no pueden perderse a través del amplificador operacional 50 porque la impedancia de entrada de tal amplificador es enorme, llegando de hecho a un circuito abierto.

Así, el conmutador electrónico 48 se abre cuando la señal en 78 es mayor que la señal en 79. Sin embargo, los máximos de la señal 74 se almacenarán en el

27 EN 1976

capacitor integrador 77. La señal almacenada en 52 es com-  
parada así con la señal instantánea en 46 en el comparador  
53, cuya salida controla el conmutador 48, de manera que  
este conmutador se mantiene cerrado solamente cuando la  
5 entrada variable en 47 es superior a un valor previamente  
almacenado. Por consiguiente, el conmutador 48 está normal-  
mente cerrado (ninguna señal en 52) y se abre cuando la se-  
ñal 74 desciende por debajo de su anterior valor almacena-  
do.

10 La deseada señal positiva de dispersión por  
el antígeno en 52 se suma en un amplificador de suma alge-  
braica 54 a una adecuada señal escalonada negativa aplica-  
da en 81, a una señal negativa de "blanco" anticuerpo apli-  
cada en 82, ajustada del modo que seguidamente se descri-  
birá, y a una señal almacenada negativa de "blanco" de sue-  
15 ro (antígeno) procedente de un integrador 83, aplicada en  
84. La señal de salida del amplificador 54 se pasa a tra-  
vés de un elemento conmutador cronometrado 85 a un dispo-  
sitivo indicador digital 56. La indicación proporcionada  
20 por el dispositivo 56 tiene lugar durante un período selec-  
cionado de funcionamiento del amplificador de suma algebrai-  
ca 54, controlado por un cronometrador de computación ma-  
nualmente activado 86. Este cronometrador se destina a pro-  
porcionar un período de muestreo de señales de varios se-  
25 gundos por lo menos, a fin de discriminar adecuadamente  
grandes partículas de polvo o elementos extraños análogos.

Cuando el cronometrador 86 es activado por su  
conmutador de puesta en marcha, mostrado en 87, descarga  
al capacitor 77 de almacenamiento de señales cerrando momen-  
30 táneamente un conmutador de reajuste 88 conectado a través



del capacitor, cierra al elemento conmutador 76 y abre al elemento conmutador 85. Esto proporciona varios segundos para la acumulación de la señal de dispersión por el antígeno en el capacitor 77. Al final del período cronometrado, el elemento conmutador 76 se abre y se cierra, produciendo la indicación digital en el dispositivo 56.

La señal negativa de ajuste de "blanco" anticuerpo en 82 se obtiene de un potenciómetro 90 conectado a una adecuada fuente de voltaje. El potenciómetro se ajusta (con su conmutador de control 91 cerrado) para proporcionar una señal negativa en 82, de modo que produzca una lectura cero en el dispositivo 56 en un ensayo anterior sobre una muestra de referencia en blanco de material anticuerpo.

La señal negativa de "blanco" de antígeno (suero) en 84 comprende una señal de compensación obtenida de la salida del amplificador de suma algebraica 54, con el conmutador 91 de "blanco" anticuerpo abierto, en un ensayo anterior sobre una muestra de referencia ordinaria de antígeno antes de añadirse material anticuerpo. Esta señal de "blanco" antígeno (suero) se almacena en el integrador 83 activando un conmutador de "ajuste" 93 durante tal ensayo anterior. La señal negativa almacenada de "blanco" de antígeno es utilizable luego para suministrar la requerida señal negativa compensadora de "blanco" antígeno (suero) en 84, durante el ensayo sobre la mezcla final que anteriormente se describe.

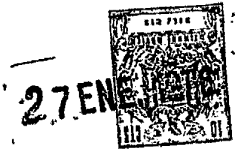
Se verá por consiguiente que, sustrayendo la señal preajustada de "blanco" anticuerpo en 82 y la señal de "blanco" de antígeno almacenada en 84 de la señal de



ensayo principal en 52, se efectúa la requerida discriminación de otras partículas, tales como de anticuerpo libres y otras presentes en el citado "blanco" anticuerpo, así como de antígeno libres y otras presentes en el "blanco de suero y la indicación digital de las partículas del complejo inmunoquímico no es afectada por la presencia de tales otras partículas en la mezcla de ensayo final. Esta indicación digital puede usarse por consiguiente para proporcionar una indicación precisa de la cantidad de antígeno originalmente presente en una muestra después de que ésta ha sido expuesta a una conocida cantidad de reactivo anticuerpo.

El funcionamiento del sistema de la figura 5 puede comprenderse más fácilmente si se compara con el de la versión más sencilla de la figura 6. Estas dos versiones difieren en que el sistema de la figura 6 es un sistema de cuatro canales, en el que se realizan simultáneamente cuatro mediciones ópticas y se procesan, también simultáneamente, para producir la deseada indicación de la medición en 56a. En el sistema de la figura 5, se efectúan secuencialmente las cuatro mediciones ópticas correspondientes se almacenan los resultados de los tres primeros ensayos y se combinan éstos con la cuarta medición para ofrecer una indicación de la medición en el indicador digital 56a.

En la figura 6 hay cuatro estaciones de ensayo óptico, 11a a 11d. En la estación 11a, se realiza una medición de la dispersión de avance de la solución neutralizadora, que es obtenible en una pureza tal que contenga una cantidad insignificante de polvo. Cada uno de los otros



reactivos biológicos que han de usarse, el anticuerpo y el suero, que se miden en las estaciones 11b y 11c, tiene necesariamente polvo, debido a la manera en que se obtienen. En la cuarta estación se mide una solución que contiene como ingredientes la muestra de suero y anticuerpo, que reaccionan produciendo el complejo inmunoquímico cuya concentración ha de indicarse en 56a.

La señal presente en la línea 101 es una que corresponde sustancialmente sólo a la propiedad dispersante del neutralizador puro. Como este neutralizador se encuentra en las mezclas en las estaciones 11b a 11d, y la señal del mismo es análogamente sustraída de otras señales en los amplificadores de diferencias 108 a 110, la señal del neutralizador establece de hecho el punto de operación cero o referencia de comparación para el instrumento.

Las señales presentes en las líneas 102 a 104 son irregularmente afectadas por el polvo y las señales procedentes de éste son eliminadas por medio de los circuitos de memorias de puntos mínimos 105 a 107. Estos circuitos corresponden al circuito de memoria de puntos mínimos de la figura 5, comprendiendo el capacitor integrador 77, el diodo 49, el conmutador electrónico 48 y el comparador 53,

Las señales de los amplificadores diferenciales 108 a 110, cuando se combinan en el sentido propio en el amplificador de suma algebraica 54a, producen la señal del complejo inmunoquímico que se envía al indicador de medición 56a.

Se verá, siguiendo las señales de la figura 6, que cada una de las señales indeseadas es eliminada de la



salida del amplificador de sūma algebraica 54a, por cancelación en las memorias de puntos mīnimos 105 a 107 ó por sustracción en los amplificadores diferenciales 108 a 110 o en el amplificador de suma algebraica 54a.

5                   La figura 7 es un diagrama en bloques simplificado de la invención, que muestra cómo se consiguen los objetivos. No se ha intentado ilustrar los circuitos efectivos, sino mostrar características funcionales. Probablemente la mejor manera de describir el funcionamiento del sistema consiste en seguir el protocolo y explicar lo que ocurre cuando el operador ajusta los mandos o impulsa los diferentes botones. A tal fin, el diagrama muestra, junto al lugar adecuado del circuito, el rótulo fijado al control del panel frontal manipulado por el operador durante el ensayo.

10

15

Un detalle importante que ha de recordarse para la adecuada comprensión es el de que hay cuatro posiciones para el CONMUTADOR DE MUESTRAS: BLANCO NEUTRALIZADOR, BLANCO ANTICUERPO, BLANCO DE MUESTRA y LECTURA DE MUESTRA, que son mutuamente exclusivas.

20

Instrucciones para la realización del ensayo

A. Después de un calentamiento de 30 minutos, conectar ALTO VOLTAJE. Con ello se conecta un voltaje negativo al cátodo del tubo fotomultiplicador.

25

B. Levantar la cubierta de la estación de muestreo. Colocar el conmutador de BLANCO DE FOTOMETRO en MEDIO y el conmutador de SENSIBILIDAD en X30. Ajustar el medidor analógico en cero usando los controles finos del BLANCO DE FOTOMETRO. Esta operación establece un "cero"

30

27ENE.



electrónico.

5 C. Colocar un tubo que contenga la más elevada concentración de "referencia" de antígeno/anticuerpo en la estación de muestreo y ajustar los controles de sensibilidad hasta que el medidor analógico indique "9" (o cualquier otro valor acordado). El ajuste de la sensibilidad asegura el que todas las demás lecturas estén a escala.

10 D. Colocar el CONMUTADOR DE MUESTRAS en BLANCO NEUTRALIZADOR. El medidor digital se conecta a la salida del fotómetro de ganancia variable. Todas las demás partes del circuito se desconectan del medidor digital.

15 E. Insertar el tubo de blanco neutralizador en la estación óptica y ajustar el valor del medidor digital a cero, usando los controles de sustracción de BLANCO DE FOTOMETRO. Para la mayoría de los experimentos de inmunología, el conmutador basto para el BLANCO DE FOTOMETRO permanecerá ajustado en la posición MEDIA.

20 Se sustraerá entonces el error aportado por la dispersión del neutralizador de todas las lecturas subsiguientes, efectuadas sobre otros tubos.

25 F. Ajustar el potenciómetro de BLANCO ANTICUERPO totalmente en el sentido de las agujas del reloj hasta la posición cero. Esto asegura el que en la siguiente operación la sustracción del blanco de anticuerpo sea puesta a cero.

G. Ajustar el CONMUTADOR DE MUESTRAS en BLANCO ANTICUERPO; con los siguientes resultados:

30 i. El integrador se reajusta a cero y por consiguiente la entrada nº 3 al amplificador final es



nula.

ii. La entrada nº 2 al amplificador final se conecta al potenciómetro de BLANCO ANTICUERPO, que estaba ajustado a cero.

5                   iii. El medidor digital se conecta entonces a la salida del amplificador final. El número indicado es el resultado de la anterior operación y por consiguiente es ignorado.

10                   H. Insertar el tubo de blanco anticuerpo en la estación óptica y pulsar COMPUTO. Primeramente se reajusta a cero la memoria de puntos mínimos y luego el detector de estos puntos examinará la salida del fotómetro de ganancia variable durante un período predeterminado establecido por el control de TIEMPO DE COMPUTACION y al  
15                   final de ese período almacenará la amplitud más baja que haya ocurrido. El medidor digital indica ese mismo valor, puesto que las entradas 2 y 3 del amplificador final son cero.

20                   I. Ajustar el potenciómetro de BLANCO ANTICUERPO en sentido contrario al de las agujas del reloj hasta que el medidor digital indique cero. Se incrementa el voltaje en la clavija 2 del amplificador final hasta que iguale el valor existente en la salida del detector de puntos mínimos. Como ese valor es el del blanco de  
25                   anticuerpo, este último valor es permanentemente registrado en el potenciómetro.

30                   J. Ajustar el conmutador de MUESTRAS en la posición BLANCO DE MUESTRA. El medidor digital indica todavía la salida del amplificador final, el integrador está ajustado todavía en cero y el potenciómetro de BLANCO

27 ENE 1970

ANTICUERPO está inhabilitado. El número indicado es el valor del blanco de anticuerpo obtenido en las operaciones anteriores.

5 K. Insertar el tubo del blanco de muestra en la estación óptica y pulsar el botón de COMPUTO. La memoria de puntos mínimos se reajusta a cero. El detector de puntos mínimos examina la salida del fotómetro de ganancia variable y almacena el punto mínimo. El número indicado en el medidor digital es por consiguiente el valor  
10 del blanco de suero.

L. Se ajusta el conmutador de MUESTRAS a la posición LECTURA DE MUESTRA. El medidor digital indica todavía la salida del amplificador final. La acción de pasar a "lectura" activa el cronometrador de medios segundos  
15 que controla los contactos  $K_{1a}$  y  $K_{1b}$ . El contacto  $K_{1a}$  acorta la entrada nº 2 del amplificador final durante el primer medio segundo. El contacto  $K_{1b}$  conecta la entrada del integrador a la salida del amplificador final; como resultado de ello, la entrada nº 3 del amplificador final aumen  
20 tará gradualmente hasta que sea igual a la entrada nº 1 (recuérdese que la entrada nº 2 es todavía cero). Por consiguiente, el medidor digital pasará a una lectura de 000,0. Al final del período de medio segundo, se abrirán  $K_{1b}$  y  $K_{1a}$ . El valor en la entrada nº 3 será mantenido y corres-  
25 ponderará al valor del blanco anticuerpo, puesto que el potenciómetro de éste último está también conectado. Como la entrada nº 1 es también el valor del blanco de suero, el medidor indica ahora un valor negativo para el blanco anticuerpo.

30 M. Insertar el tubo que contiene el complejo



5 inmunoquímico de antígeno/anticuerpo en la estación de  
lectura y presionar el botón de COMPUTO. Primeramente se  
reajusta a cero el detector de puntos mínimos. Luego exa  
mina el valor del fotómetro de ganancia variable y alma  
cena el punto mínimo que se aplica a la entrada nº 1 del  
amplificador final. Este valor corresponde a la concentra  
ción de complejo inmunoquímico de antígeno/anticuerpo más  
el blanco de anticuerpo y suero. Como las clavijas 2 y 3  
contienen los valores anteriormente obtenidos de los blan  
cos anticuerpo y de suero, respectivamente, el valor obte  
nido en el medidor es la concentración de complejo inmu  
noquímico.

10 N. Registrar la lectura del MEDIDOR. Este es  
el único número que anota el técnico.

15 Recientemente se ha construido un prototipo  
o versión preferida de la invención, que se muestra en las  
figuras 8, 9A y 9B.

20 La figura 8 ilustra en perspectiva la vista  
externa del instrumento. En el lado izquierdo está la con  
sola eléctrica 101 y a la derecha se encuentra la unidad  
óptica 11e. Esta última tiene una cubierta 21a que está  
articulada en el borde posterior, a diferencia de la cubier  
ta rebordeada 21 de la versión de la figura 1. Evidentemen  
te, es más conveniente una cubierta articulada, pues puede  
girarse simplemente hacia arriba y hacia atrás, sobre sus  
bisagras, como se ilustra mediante las dos líneas disconti  
nuas de la figura 8, y no tiene que retirarse manualmente.  
La unidad fotomultiplicadora, con su conector de alto vol  
taje proyectado hacia atrás, está en 37a.

30 La consola 101 tiene un panel de control 102

con una serie de controles. Estos controles están roturados en la figura con sus designaciones, de manera que correspondan a las designaciones de la figura 7 y a las anteriormente señaladas en el Protocolo.

5                   Las figuras 9A y 9B muestran el diagrama de  
instalación eléctrica o cableado con mayor detalle que en  
la figura 7. Se observará que cada uno de los cuatro boto  
nes pulsadores de SELECCION DE MUESTRAS y los de AMORTIGUA  
MIENTO son autoiluminables cuando se accionan, facilitando  
10 así al operador el seguimiento de sus operaciones. Todo el  
sistema circuital electrónico es directo y usa componentes  
comunes y su acción se explica por sí misma para los exper  
tos en la materia, de acuerdo con las anteriores explica  
ciones.

15                   Aunque se han expuesto en la anterior descrip  
ción versiones específicas de un aparato perfeccionado, se  
comprenderá que los expertos pueden idear varias modifica  
ciones dentro del espíritu de la invención. Por consiguien  
te, se pretende que no se establezca ninguna limitación a  
20 la invención, salvo en el sentido definido por el ámbito  
de las adjuntas reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

Se reivindica como de propia y nueva invención, a favor de BAXTER TRAVENOL LABORATORIES, INC., con domicilio en Deerfield, Illinois 60015 (Estados Unidos),  
5 lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

1.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, mediante medición de la concentración de partículas de tamaño medio en una mezcla dotada de partículas mayores y menores, siendo las -  
10 partículas de tamaños medio y menor sustancialmente constantes en un campo macroscópico de observación y fluctuando las citadas partículas mayores en dicho campo de observación, caracterizándose dicho aparato en que comprende medios para dirigir un haz de radiación electromagnética  
15 a través de la referida mezcla de partículas; medios para establecer el referido campo de observación y para detectar y medir la dispersión en tal campo de observación del mencionado haz a lo largo de una dirección extra-axial respecto al haz, constituyendo dicha dispersión una medida de la concentración combinada de todas las partículas  
20 presentes en la mezcla; medios para suprimir la fluctuación en dicha medición, debida a la fluctuación de las partículas de tamaño mayor, mediante corte de los máximos de fluctuación de dicha medición durante un período de -  
25 tiempo, proporcionando así una medición firme determinada por la medición mínima durante dicho período de tiempo, siendo indicativa tal medición firme de la concentración combinada de partículas de tamaños medio y pequeño en la mezcla; y medios para sustraer de dicha medición  
30 firme una cantidad conocida como representativa de la -

mE

concentración de las partículas menores, obteniéndose así una medición indicativa de la concentración de las partículas de tamaño medio, solamente, de la referida mezcla.

5           2.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 1, caracterizado en que comprende en combinación medios para medir secuencialmente la concentración de diferentes partículas de tamaño menor mediante detección y medición secuenciales de la dispersión de muestras de tales  
10 partículas de tamaño pequeño, estando relacionadas dichas muestras de partículas de tamaño menor, en cuanto a concentración, con las correspondientes concentraciones de las referidas partículas en las mezclas; medios que almacenan secuencial y automáticamente las mediciones de concentración de las diferentes partículas citadas de tamaño menor, efectuándose tal almacenamiento en el momento  
15 en que se realizan dichas mediciones secuenciales; y medios para utilizar las mediciones almacenadas en los mencionados medios de sustracción.

20           3.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 1, caracterizado en que los medios para dirigir un haz de radiación electromagnética consisten en un laser y la mezcla es un líquido contenido en un tubo de ensayo,  
25 en combinación con una cámara de extremo abierto dotada de medios colocadores elásticos para situar dicho tubo de ensayo en el haz del laser, teniendo dicha cámara una abertura de entrada en relación hermética a la luz con el referido laser y presentando también una abertura de  
30 salida en relación hermética a la luz con una trampa de

McE

luz, alineándose dichas aberturas de entrada y salida con un rayo laser para recibir respectivamente el haz no desviado antes y después de incidir sobre el tubo de ensayo, teniendo también la citada cámara una abertura detectora en relación hermética a la luz con los medios de detección y medición de la referida dispersión extra-axial del haz, incluyendo tal cámara un obturador móvil entre el laser y la abertura de entrada para ocultar el rayo laser, como asimismo una cubierta hermética a la luz para su extremo abierto; y medios para cerrar automáticamente dicho obturador siempre que la citada cubierta está abierta y para abrirlo solamente cuando esta cubierta esté totalmente cerrada.

4.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 3, caracterizado en que los citados medios destinados a establecer el referido campo de observación y a detectar y medir la mencionada dispersión incluyen: un fotodetector en un alojamiento hermético a la luz; dos diafragma limitadores de campo en el eje óptico de dicha dispersión, entre el tubo de ensayo y el fotodetector, limitando tales diafragmas la detección de luz dispersada por dicho fotodetector a una porción de la luz total que es dispersada en el tubo de ensayo, procediendo tal porción del volumen contenido en el tubo de ensayo que queda definido por los límites del rayo laser y por los límites definidos por los diafragmas de campo, de manera que la suciedad e imperfecciones presentes en las paredes del tubo de ensayo o los efectos de proximidad de la pared interna de dicho tubo sobre las partículas no afecten sustancial-

me

mente a la respuesta del fotodetector.

5                   5.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 2, caracterizados en que los citados medios destinados a medir y almacenar la dispersión de una clase de partículas de pequeño tamaño incluyen: medios para exponer una muestra estandarizada de dicha clase de partículas de pequeño tamaño al campo de observación; y medios para sustraer de la salida de los medios de medición más pequeños una cantidad ajustable y suficiente para reducir la lectura de la referida medida de dispersión a cero.

10                   6.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 5, caracterizado en que dicha muestra estandarizada es suficientemente pura para estar sustancialmente libre de polvo.

15                   7.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 5, caracterizado en que dicha muestra estandarizada contiene polvo.

20                   8.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 5, caracterizados en que la referida muestra estandarizada es una muestra desconocida, recogida bajo condiciones conocidas, que ha de ser ensayada.

25                   9.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 5, caracterizado en que los medios para sustraer comprenden una fuente de voltaje ajustable.

30                   10.- Aparato para la discriminación de ele

m/c

mentos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 1, caracterizados en que los medios para medir y almacenar la dispersión de una variedad de partículas de tamaño pequeño incluyen: medios para exponer una muestra estandarizada de la citada variedad de partículas de pequeño tamaño al campo de observación; y medios para almacenar la salida de los medios de medición de la dispersión en un integrador eléctrico.

11.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 1, caracterizado en que la citada mezcla está contenida en un tubo de ensayo, incluyéndose en dicho sistema medios para situar este tubo de ensayo dentro del referido campo de observación, definiendo un plano el eje longitudinal de tal tubo de ensayo, cuando se halla así situado, y el eje longitudinal del referido haz de radiación electromagnética, midiéndose la citada dispersión extra-axial a lo largo de un eje que se encuentra también en dicho plano.

12.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 1, caracterizado en que dichas partículas de tamaño medio, de interés, son partículas de complejo inmunológico y en el que la citada dispersión es de avance y se mide a lo largo de un eje que se extiende aproximadamente a 30° respecto al eje del haz.

13.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según las reivindicaciones anteriores, para el ensayo de un complejo inmunológico de una mezcla de muestra y antígeno mantenida en

MCE

un tubo que contenga líquido, caracterizado en que comprende: medios para sostener el tubo de tal manera que su eje central sea sensiblemente vertical; una fuente de rayos laser destinada a producir un haz de luz esencialmente monocromática, que sea estrecho respecto al diámetro del tubo que contiene la mezcla, situándose la citada fuente de modo que proyecte el haz laser a través de la pared lateral del tubo, de tal manera que pase a través del líquido contenido en el mismo, por el eje central del tubo o cerca de él, y de tal manera que el haz laser forme sensiblemente ángulo recto con dicho eje central del tubo; medios fotoprotectores para recibir luz diseminada hacia adelante, los cuales medios interceptan toda la luz excepto la procedente de una trayectoria extendida a través del tubo y de la zona que la circunda, cruzando dicha trayectoria a través del haz de luz laser desde las paredes del tubo, y encontrándose aproximadamente en el mismo plano que el haz citado y el eje del tubo; y medios para detectar la luz diseminada a lo largo de la trayectoria definida por dichos medios fotoprotectores y para proporcionar un resultado del ensayo basado en la luz detectada.

14.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 13, caracterizado en que la trayectoria definida por los citados medios fotoprotectores desde el referido haz laser se extiende por encima de éste último con un ángulo de  $30^\circ$  aproximadamente en el interior del líquido.

15.- Aparato para la discriminación de elementos extraños en ensayos ópticos, según la reivindicación 14, caracterizado en que dichos medios sustentadores

mfe



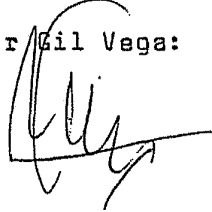
precedente, que consta de treinta y dos hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras y planos de forma y tamaño reglamentarios.

Madrid, 27 de Enero de 1976

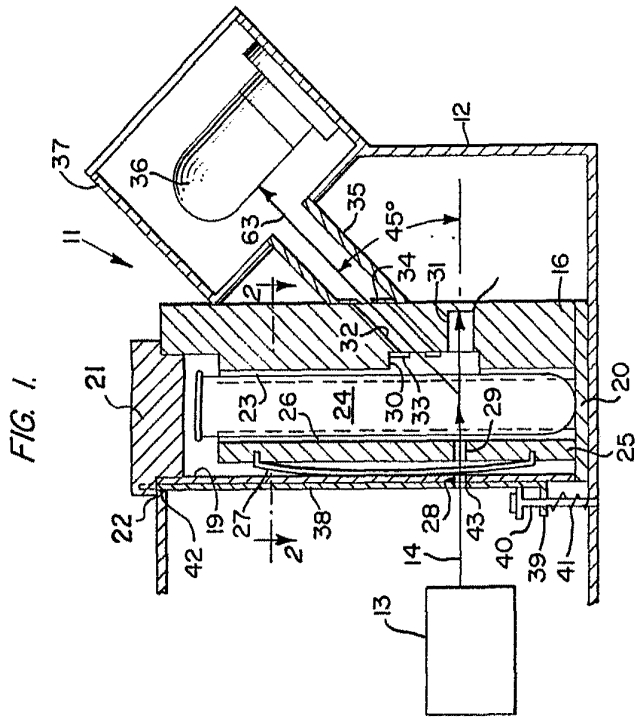
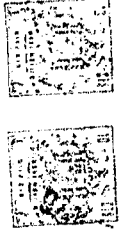
5

P.A. de BAXTER TRAVENOL LABORATORIES, INC.

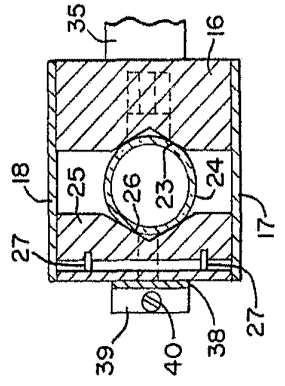
Victor Gil Vega:



mfe



**FIG. 2.**



**FIG. 3.**

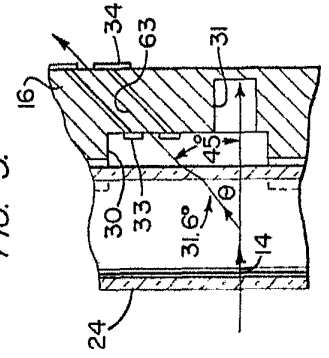


FIG. 1.

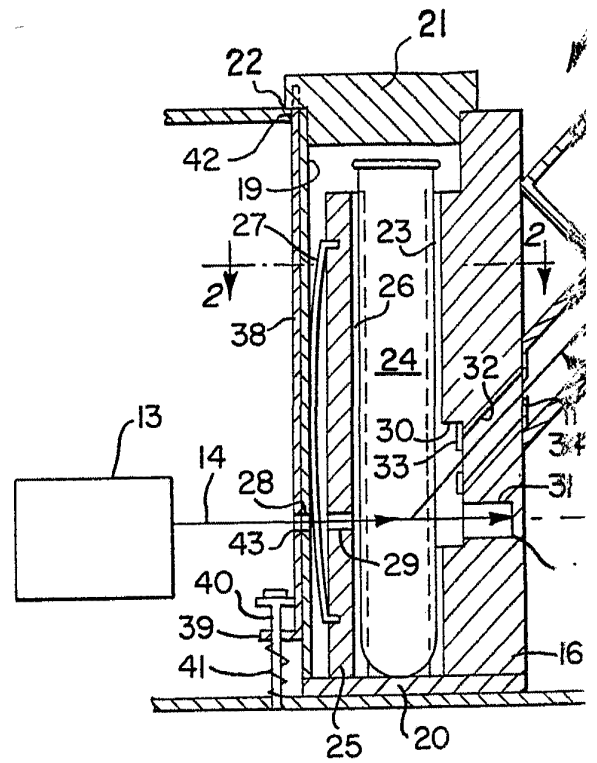


FIG. 2.

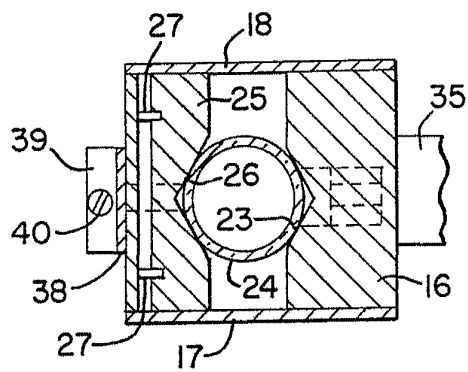




FIG. 1.

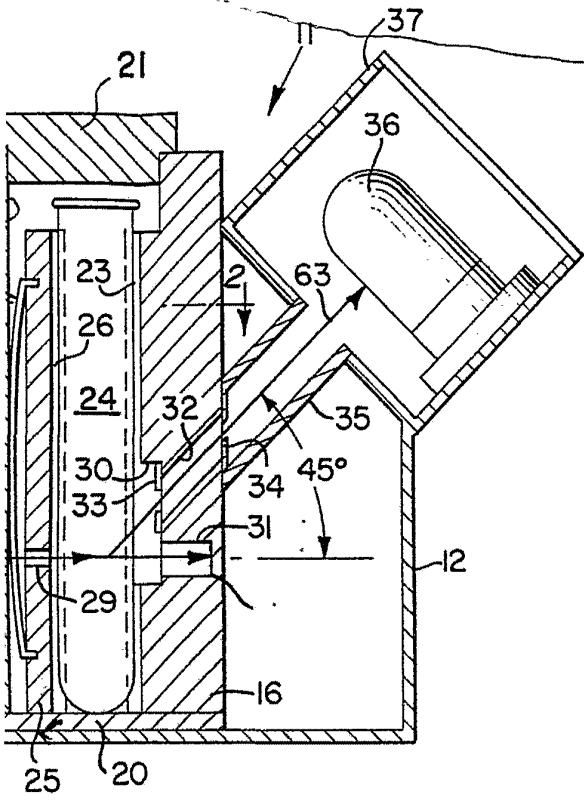
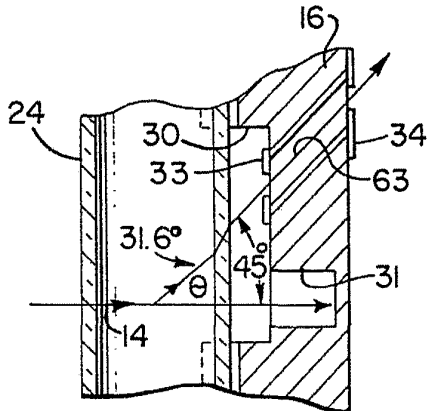


FIG. 3.



35  
5

271.5.1

Handwritten signature or mark.

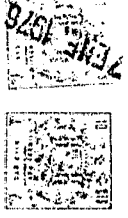


FIG. 4.

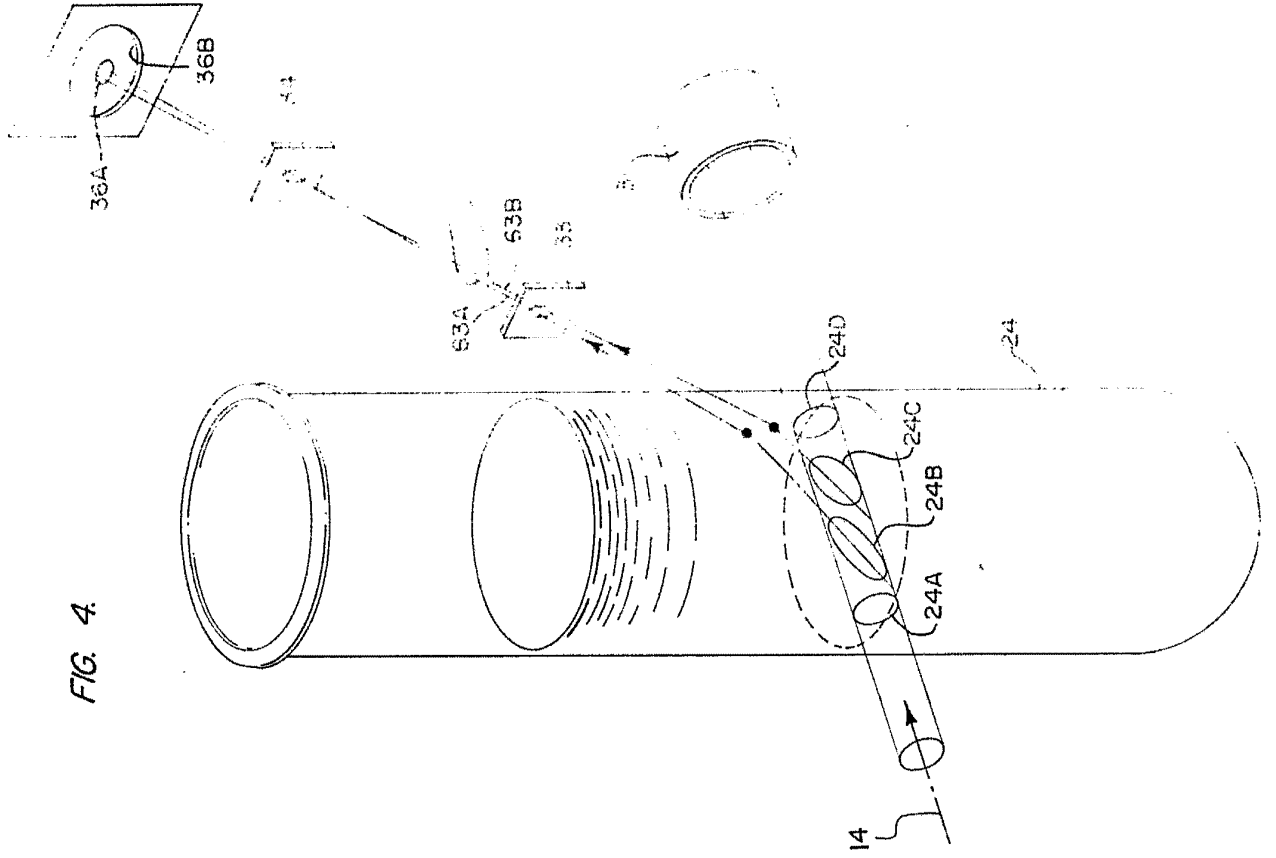
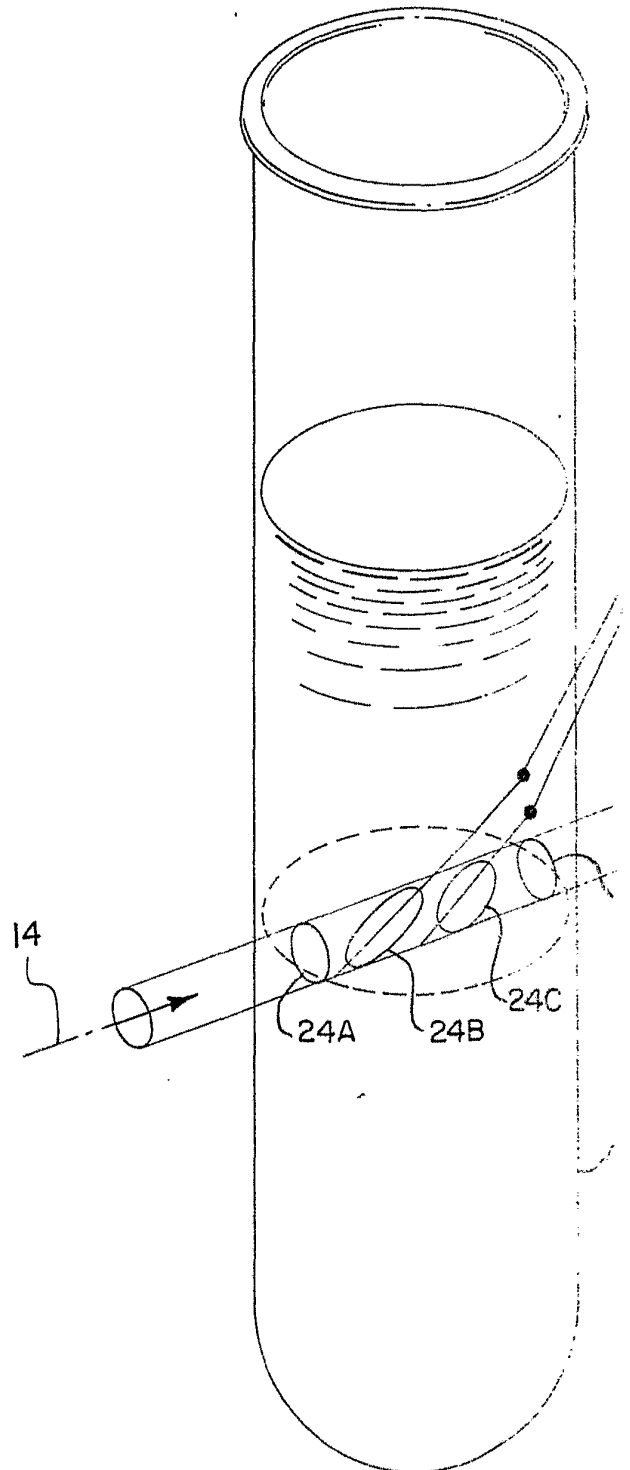
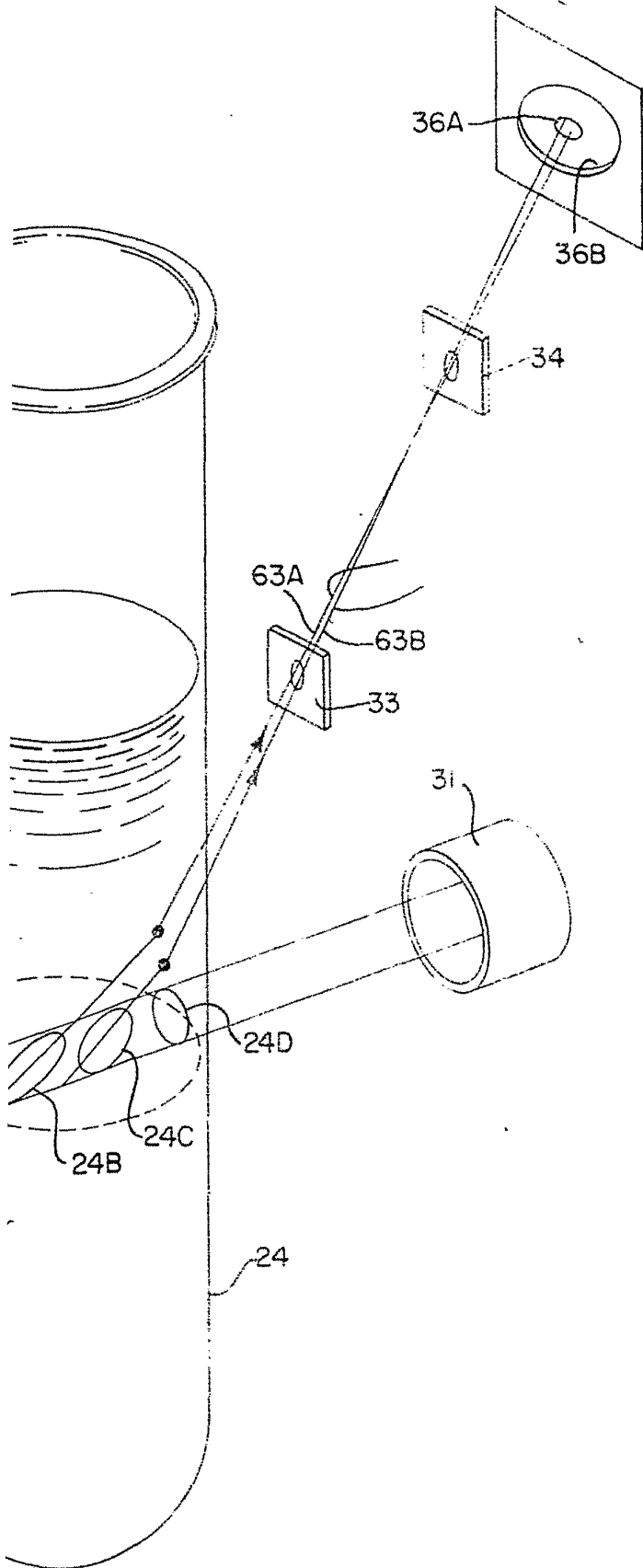


FIG. 4.



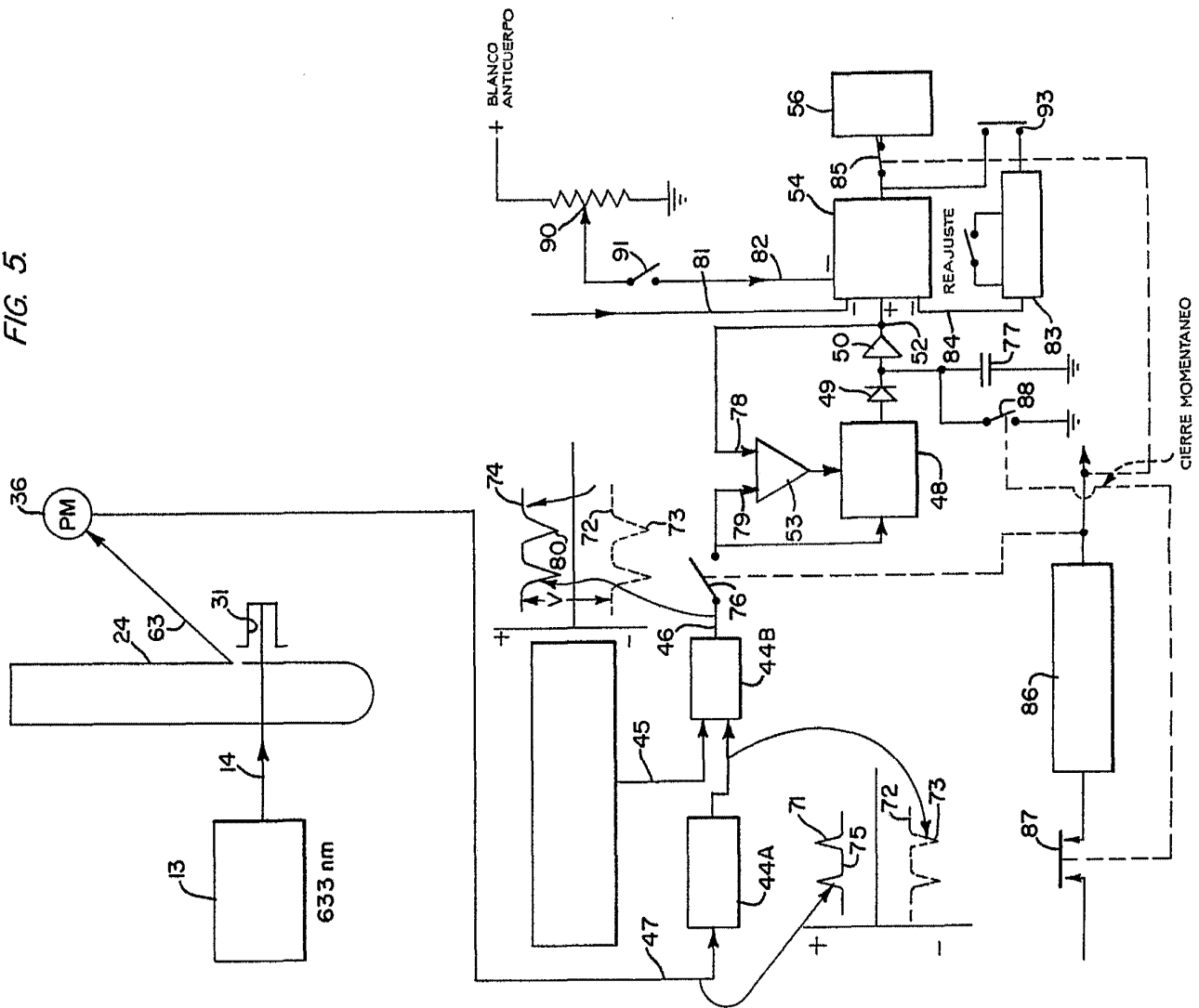
ESCALA VARIABLE

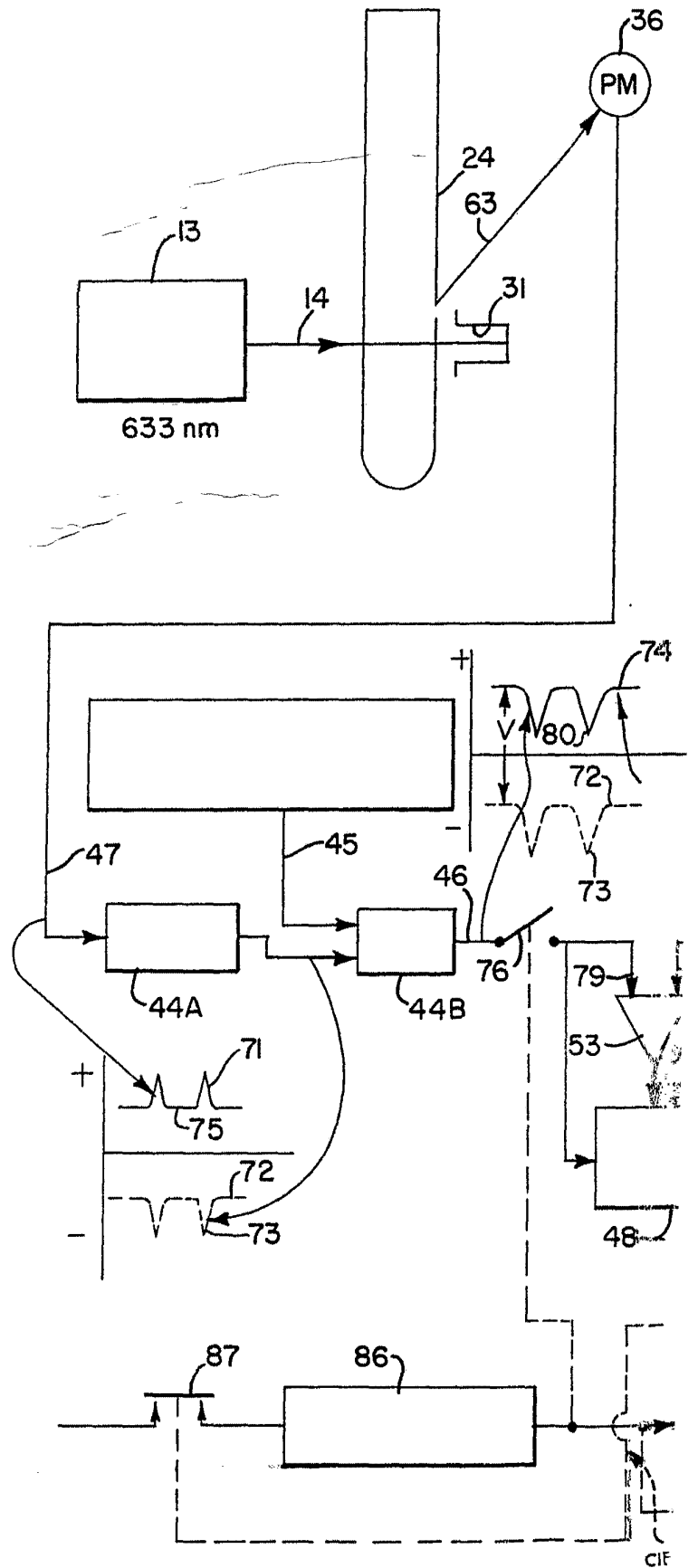


9 - VARIOUS

11  
2/11

FIG. 5.





ESCALA VARIABLE



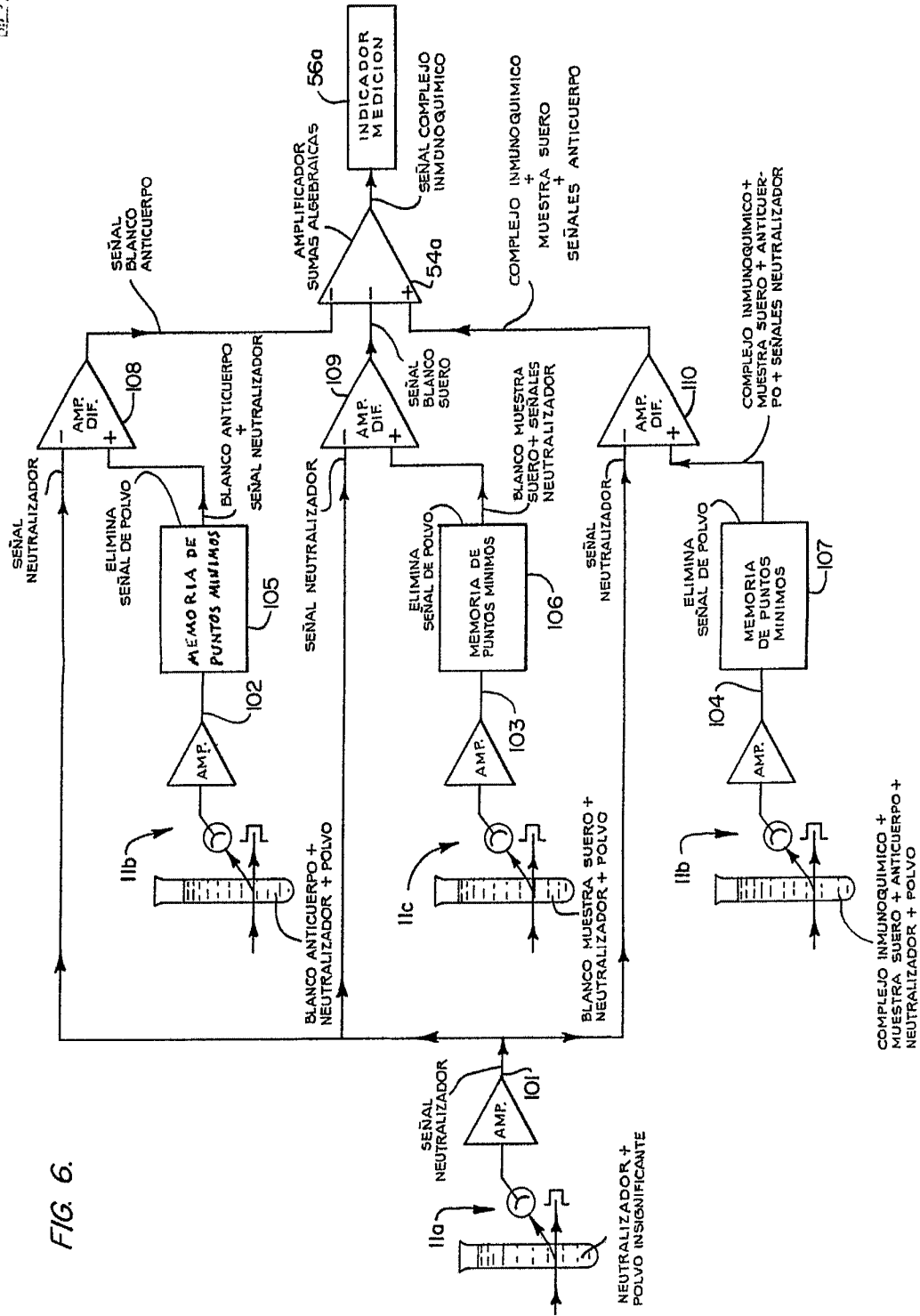
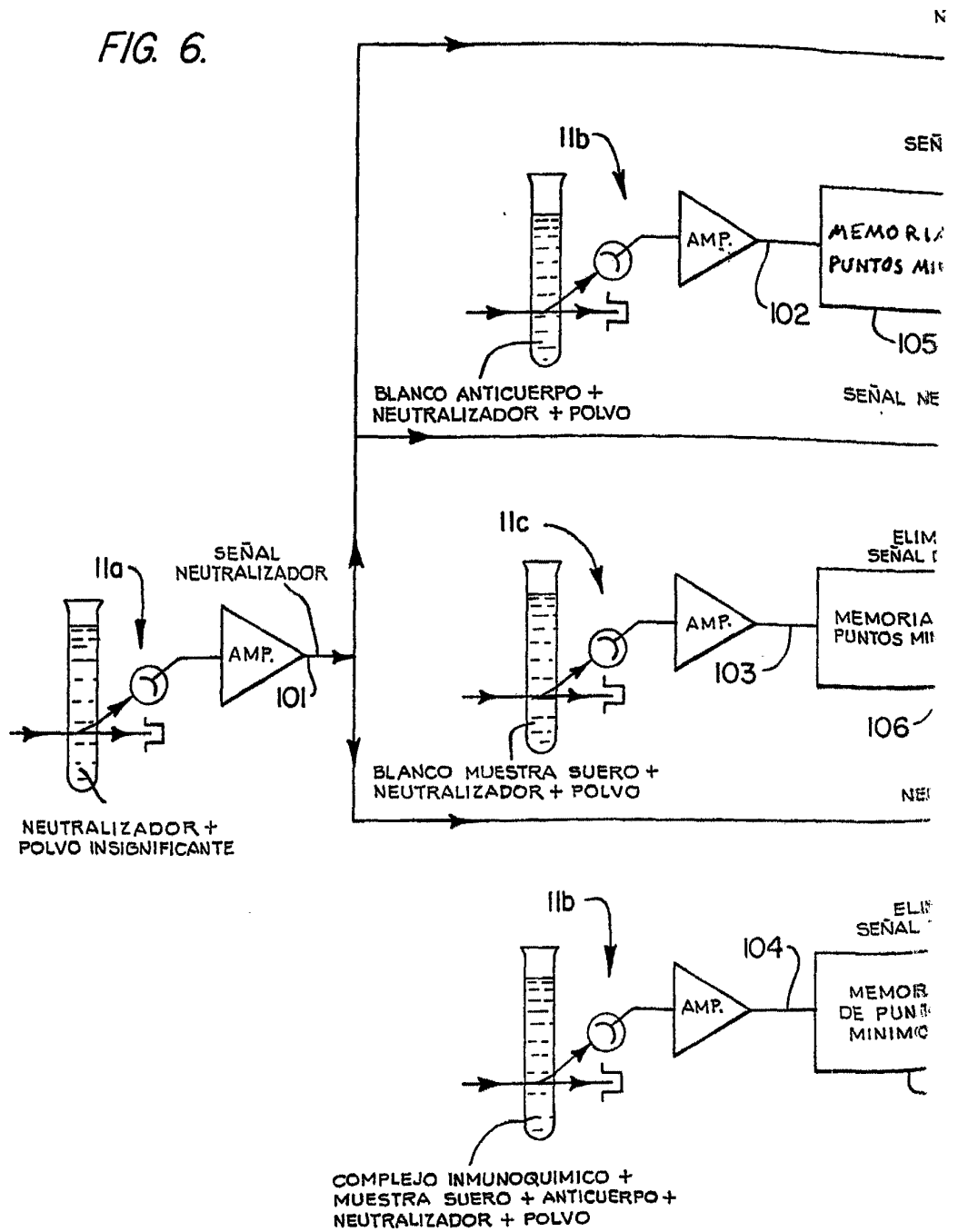


FIG. 6.

FIG. 6.



ESCALA VARIABLE

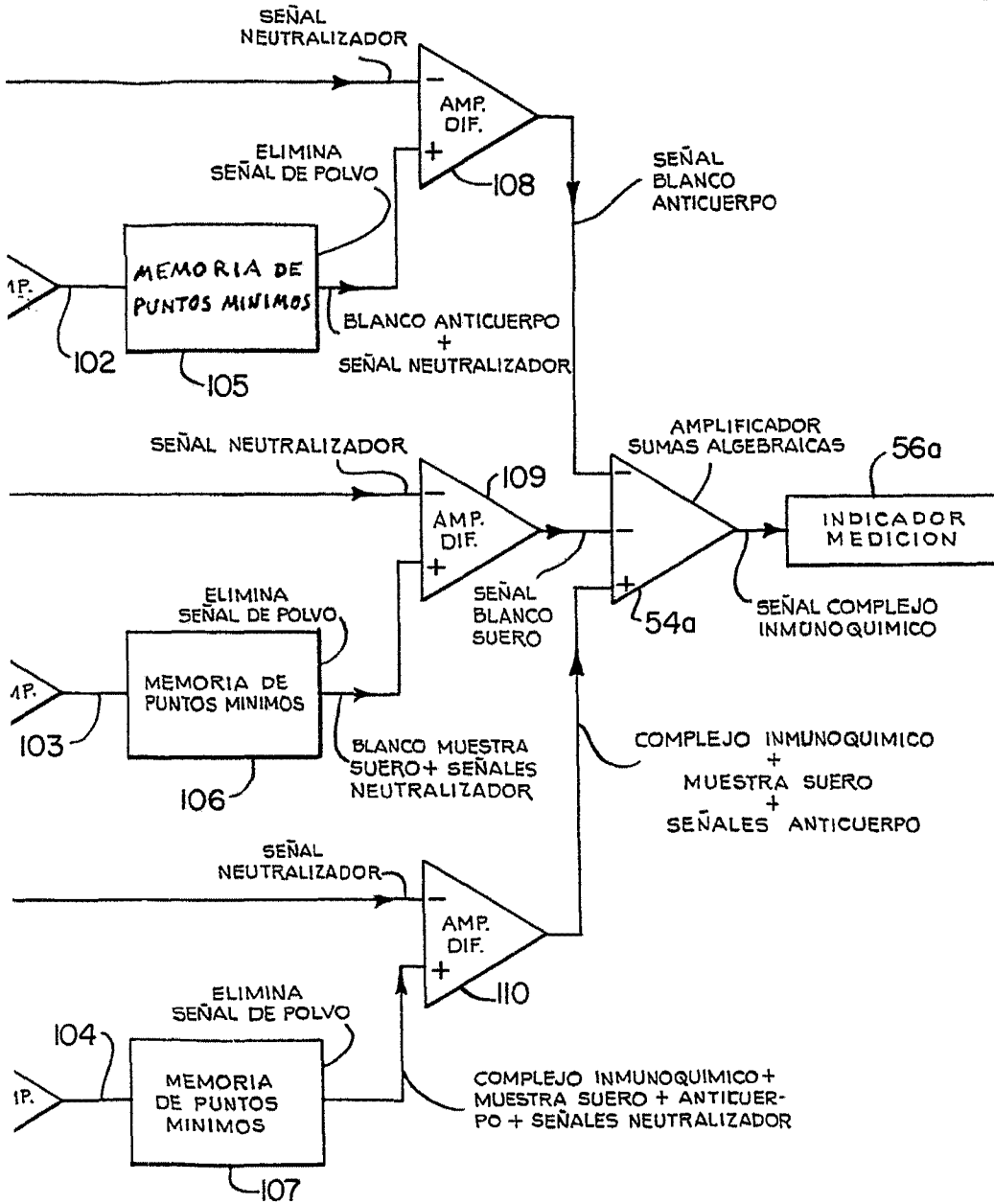
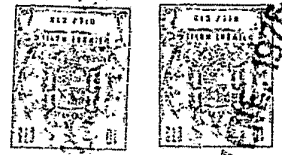


FIG. 7

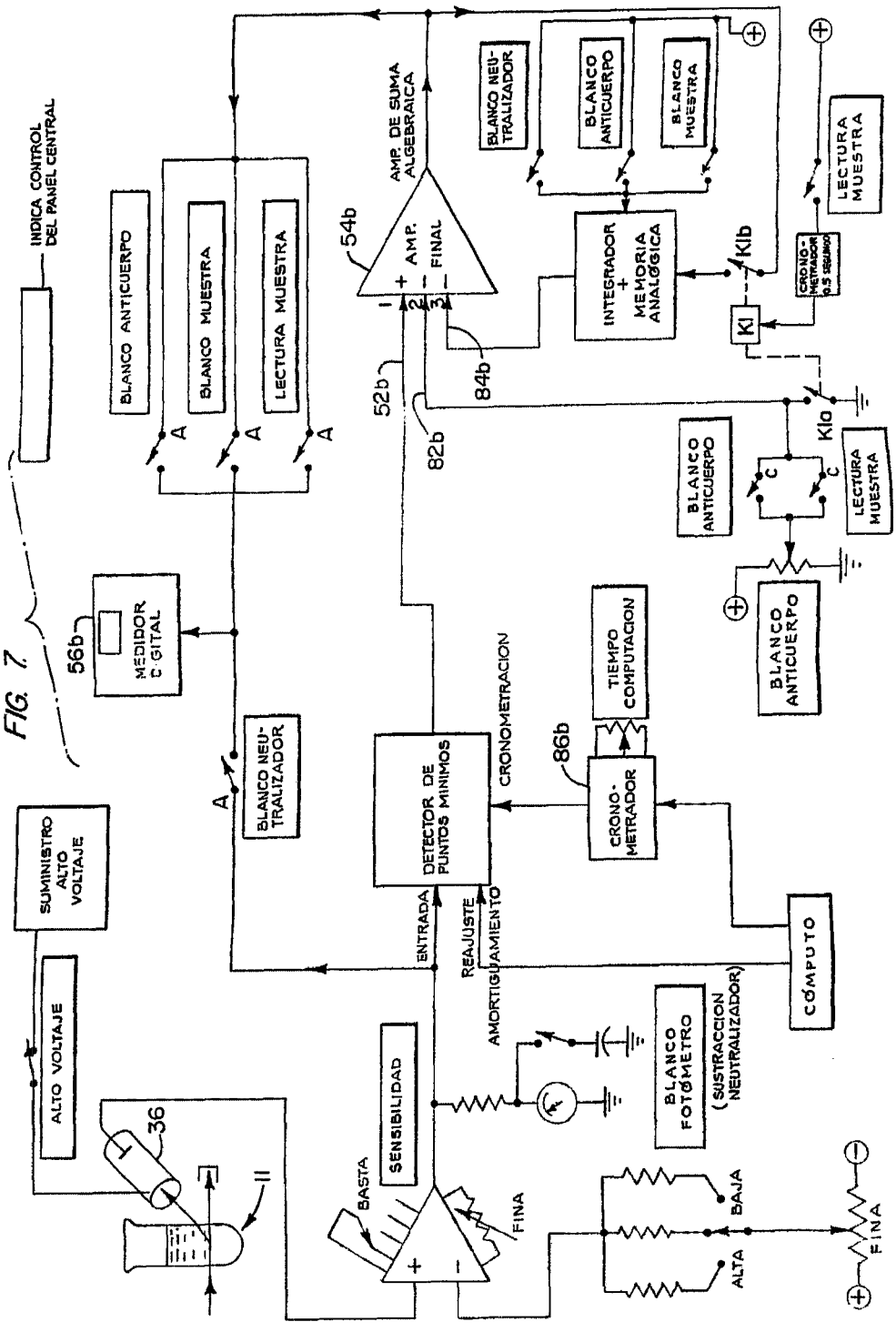
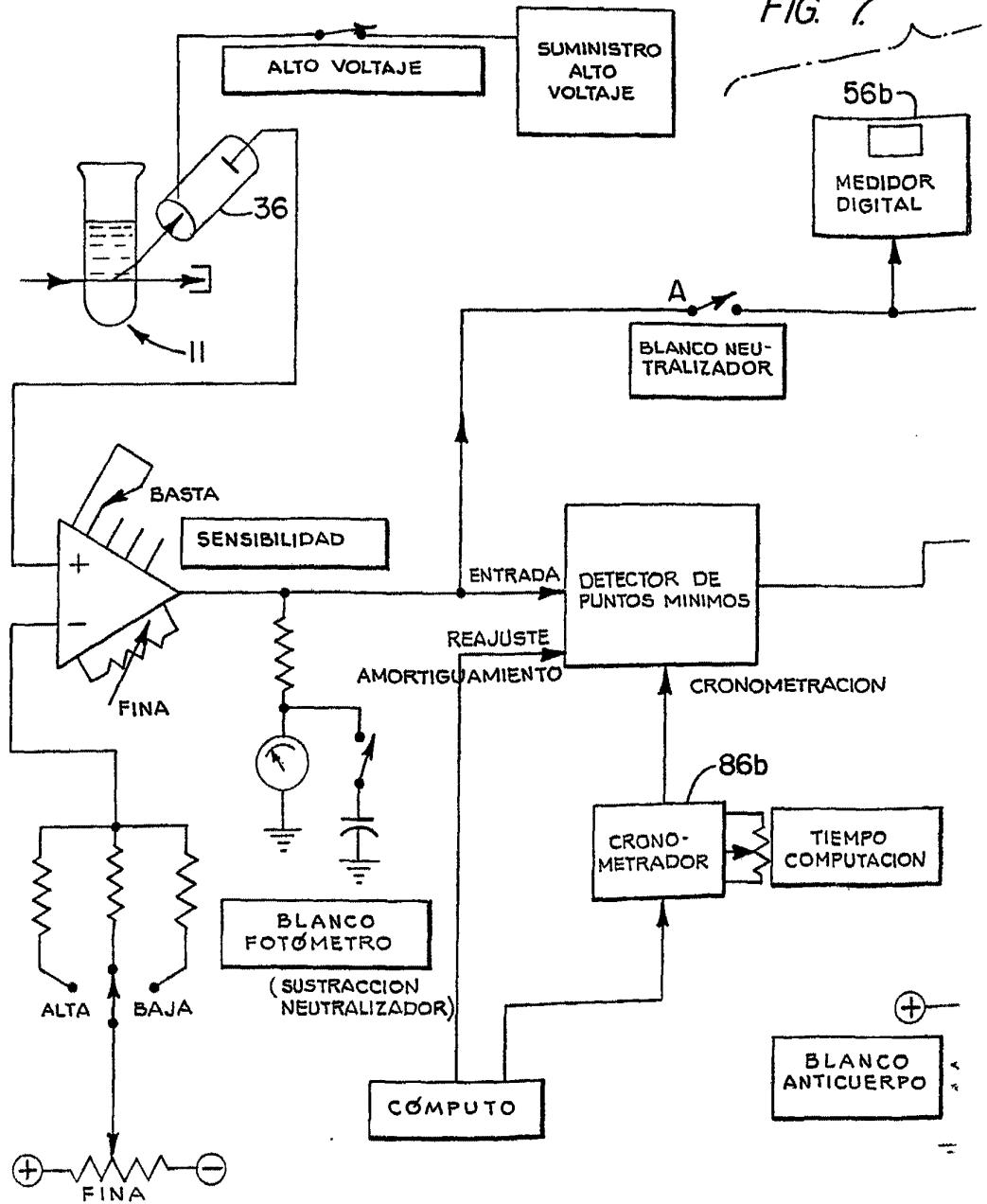


FIG. 7



ESCALA VARIABLE



FIG. 8.

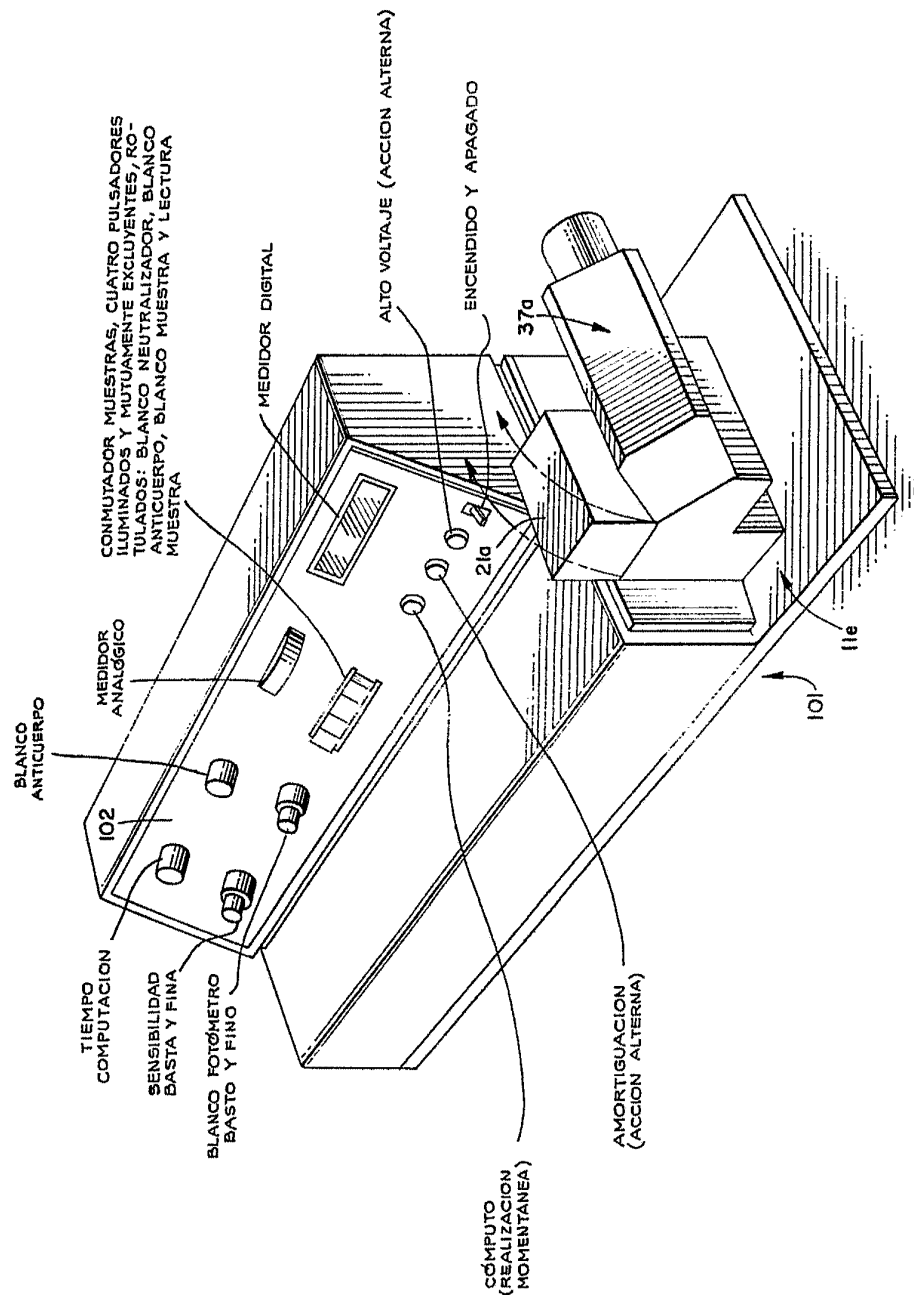
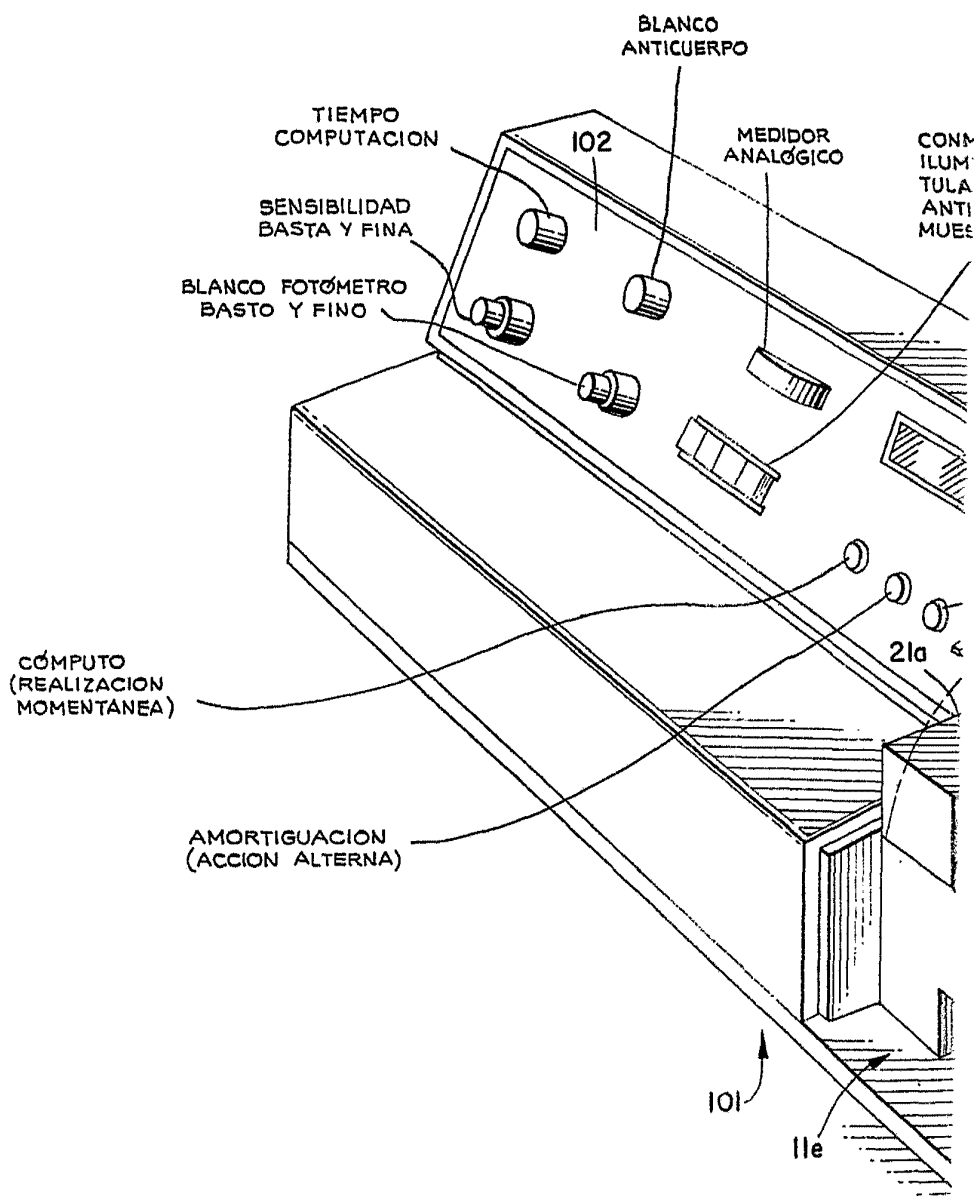


FIG. 8.



ESCALA VARIABLE

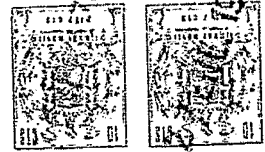
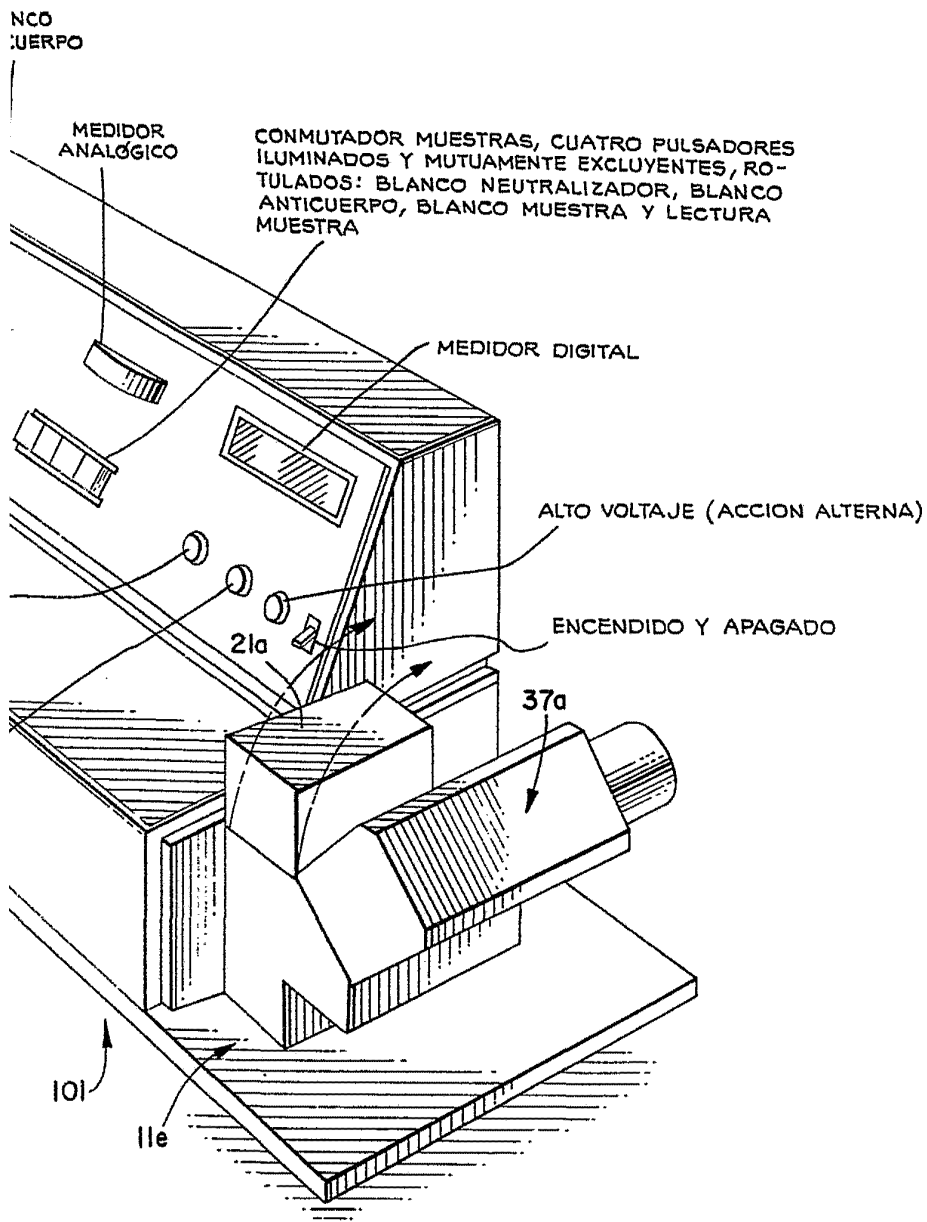
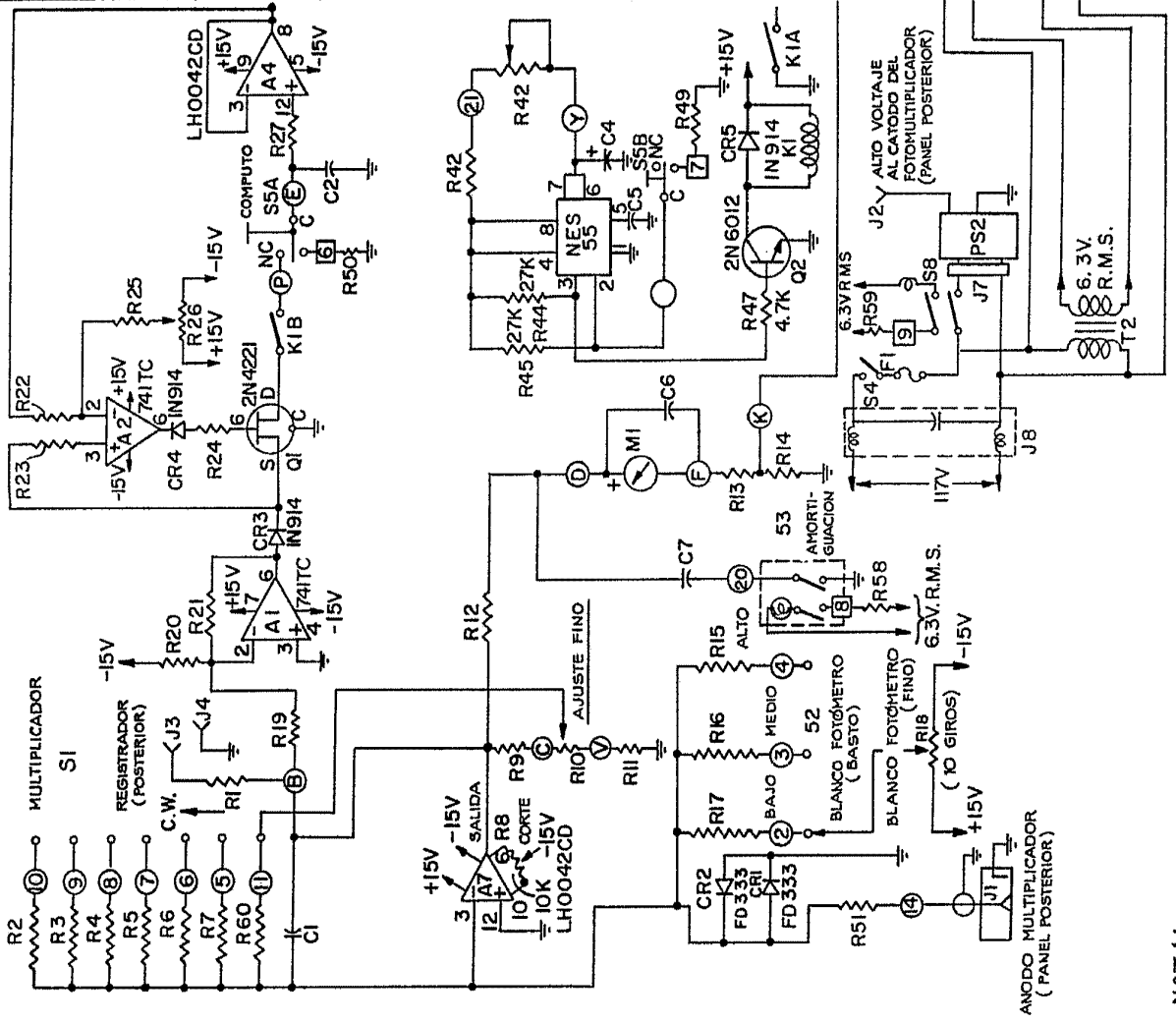


FIG. 8.



20/7

FIG. 9A.



NOTA:

- = CLAVIJA ENTRADA A CONECTOR J6 TABLERO ENERGIA
- = CLAVIJA ENTRADA A CONECTOR J5 TABLERO PRINCIPAL





FIG. 9B.

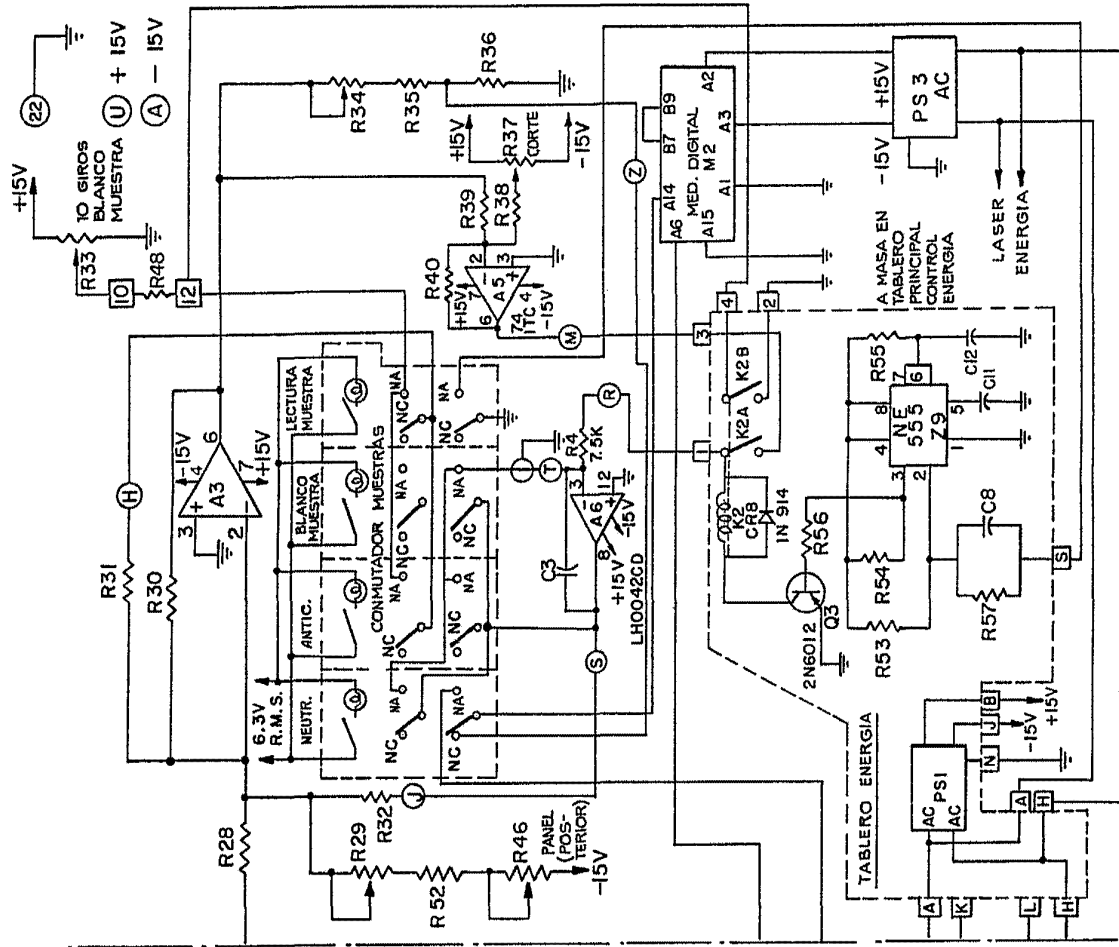


FIG. 9B.

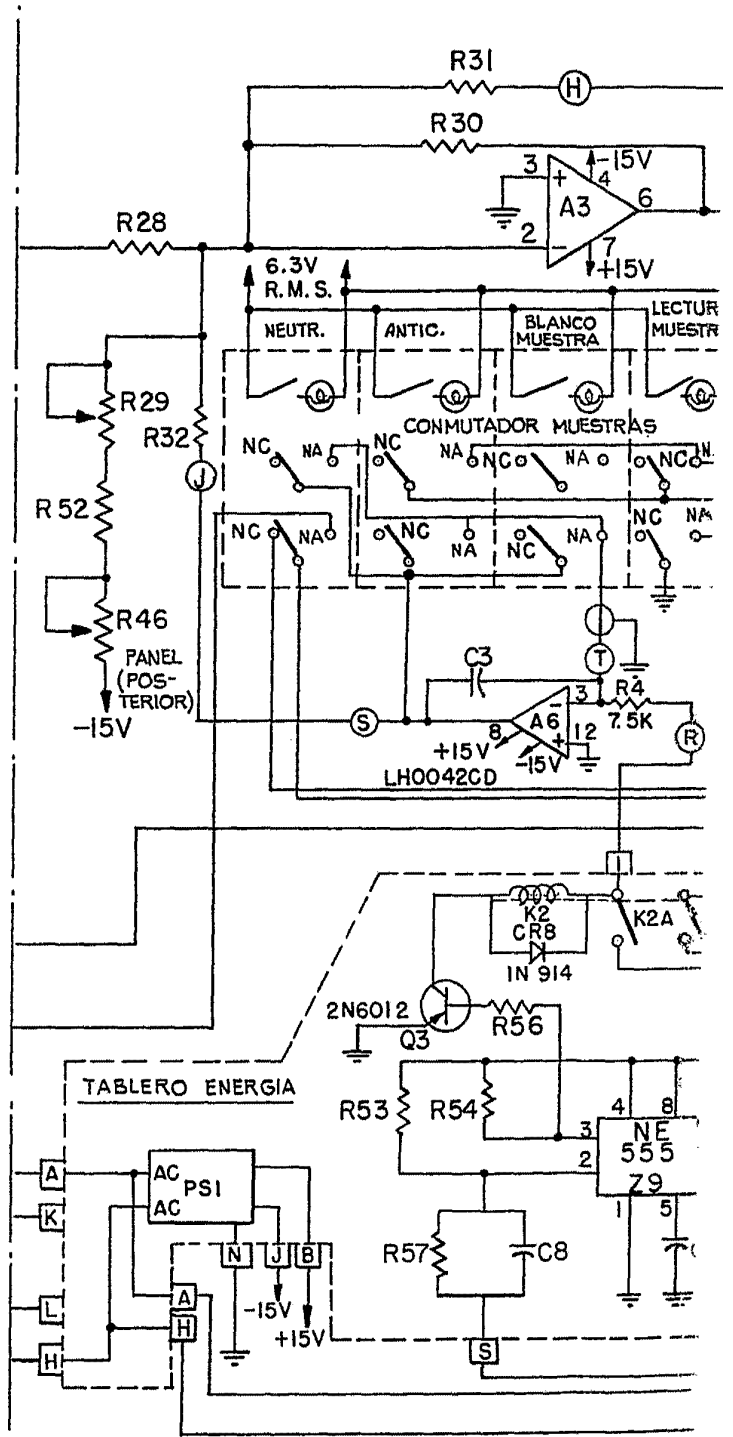
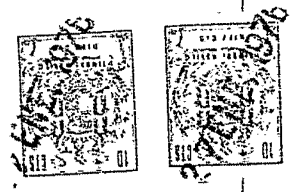
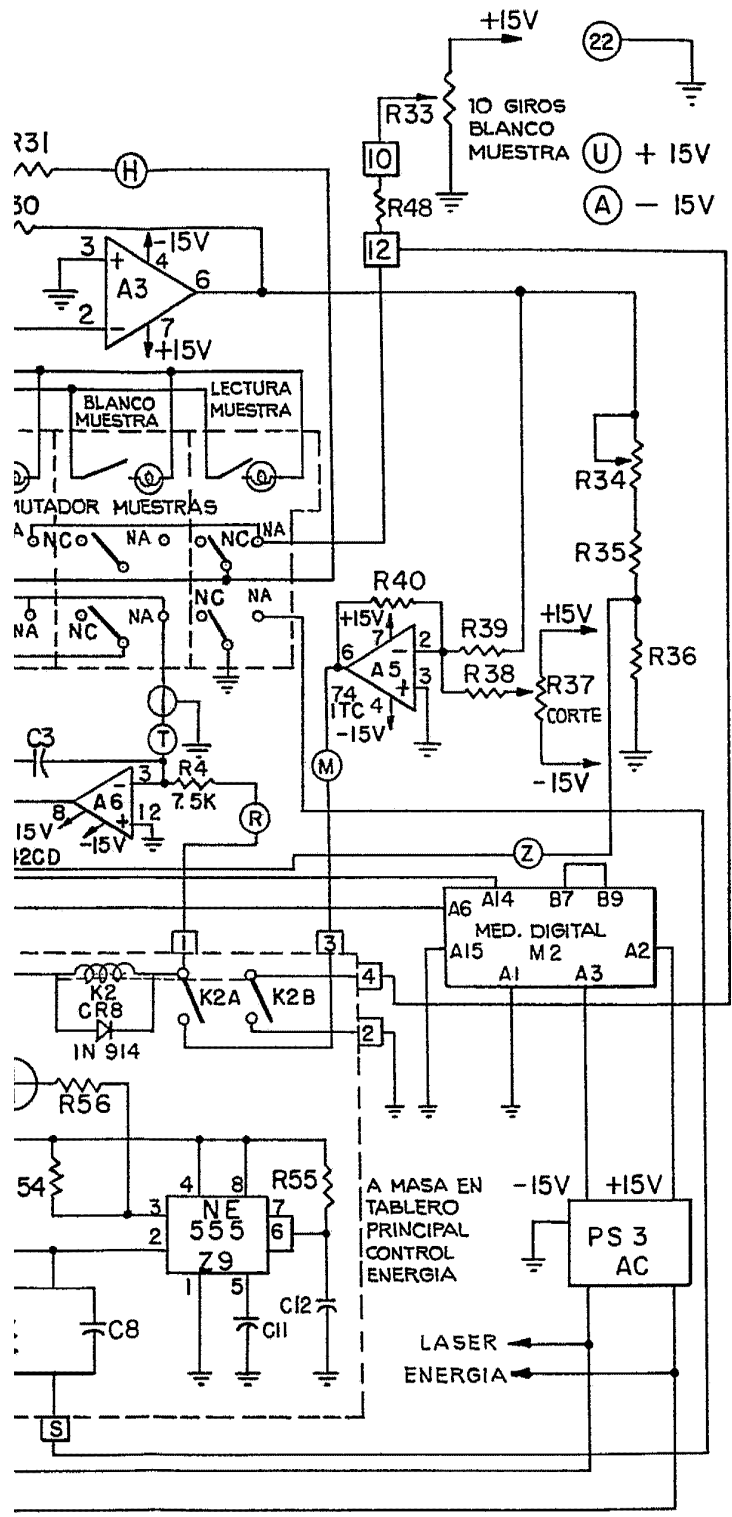


FIG. 9B.



100