

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 770**

21 Número de solicitud: 201130299

51 Int. Cl.:

G01N 29/00 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

04.03.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.10.2012

Fecha de la concesión:

21.08.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

02.09.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (50.0%)
Hospital Real, Cuesta del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES y
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD**

72 Inventor/es:

**RUS CARLBORG, Guillermo;
BOCHUD, Nicolás;
MELCHOR RODRIGUEZ, Juan Manuel;
CHIACHIO RUANO, Juan y
CHIACHIO RUANO, Manuel**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **DISPOSITIVO Y MÉTODO DE MONITORIZACIÓN DE MUESTRAS.**

57 Resumen:

Dispositivo y método de monitorización de muestras. La presente invención hace referencia a un dispositivo y a un método para la monitorización por ultrasonidos de muestras bajo estudio, siendo dichas muestras, preferentemente, cultivos tisulares o cultivos celulares. Más en particular, la invención se refiere a una placa de cultivo conectada a un emisor y un receptor de señales de onda de ultrasonidos, así como a medios de procesamiento y análisis de las señales transmitidas a través del cultivo bajo estudio, que permite la monitorización en tiempo real de las muestras, así como la medición de sus propiedades mecánicas y geométricas.

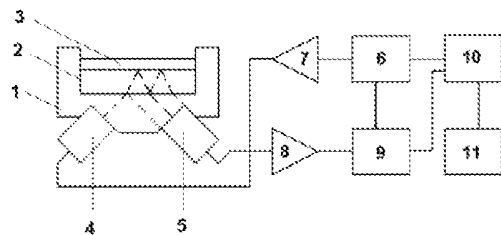


FIG. 1

ES 2 387 770 B1

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y método de monitorización de muestras.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención hace referencia a un dispositivo y a un método para la monitorización por ultrasonidos de muestras bajo estudio, siendo dichas muestras, preferentemente, cultivos tisulares y/o celulares. Concretamente, la invención se refiere a una placa de cultivo conectada a un emisor y a un receptor de señales de onda de ultrasonidos, así como a medios de procesamiento y análisis de las señales transmitidas a través del cultivo bajo estudio, que permite la monitorización en tiempo real de las muestras, así como la medición de sus propiedades mecánicas y geométricas.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La monitorización de muestras mediante ultrasonidos es una técnica bien conocida en la actualidad, que posee abundantes aplicaciones en el estudio de las propiedades mecánicas de los materiales en física e ingeniería, así como en los análisis de integridad y daños en estructuras, o en el estudio de restos arqueológicos o de obras de arte, entre otras. Adicionalmente, una importante aplicación de las técnicas de monitorización por ultrasonidos se aplica a la medicina y a la biomecánica, mediante la cual es posible estudiar las propiedades de los tejidos, huesos y otras estructuras biológicas, para su uso en el diagnóstico, evaluación y la predicción de enfermedades. La presente invención se refiere a este último ámbito.

20 Si bien hoy en día es posible encontrar numerosos dispositivos destinados a la medición de parámetros mecánicos (tales como el módulo de Young, relacionado con la compresibilidad de las muestras, la atenuación de las ondas transmitidas a través de dichas muestras, así como los módulos de compresibilidad y/o cizalladura) en muestras de tejidos biológicos con grosores del orden de centímetros, o para la evaluación *in vivo* de pacientes (estudiando, por ejemplo, fracturas óseas o tejidos afectados por alguna enfermedad), no existe en el estado de la técnica un dispositivo diseñado específicamente para el análisis mediante ultrasonidos de muestras de cultivos celulares y tisulares, con grosores comprendidos preferentemente entre 2 μ m y 2 mm. Si bien el mercado contempla algunos aparatos destinados a la monitorización mediante impedancia eléctrica basados en la oposición que presenta la muestra bajo estudio ante el paso de corrientes eléctricas generadas por microelectrodos (como, por ejemplo, en dispositivos de tipo XCELLigence de la compañía Roche), dichos aparatos llevan consigo el problema de que el paso de la corriente a través de la muestra puede interferir en el propio cultivo, alterando su estabilidad iónica, lo que provoca distorsiones en las medidas tomadas. Se hace, por tanto, necesario, desarrollar herramientas alternativas capaces de monitorizar muestras de cultivos biológicos de forma precisa y no-invasiva, es decir, que no altere las características de la muestra a medir.

La presente invención está orientada a resolver dicha necesidad del estado de la técnica.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION

35 Un objeto de la presente invención es obtener una herramienta destinada a la monitorización de muestras bajo estudio, preferentemente muestras de cultivos tisulares y/o celulares, mediante ultrasonidos.

Dicho objeto de la invención se consigue a través de un dispositivo de monitorización que comprende:

a) Una placa de cultivo configurada para alojar la muestra bajo estudio.

b) Un transductor emisor de señales de onda de ultrasonidos a las muestras bajo estudio, acoplado a la placa de cultivo en la región inferior de dicha placa.

40 c) Un transductor receptor de las señales de onda de ultrasonidos transmitidas a través de las muestras, acoplado a la placa de cultivo en la región inferior de dicha placa, situado de forma que las señales de onda emitidas por el transductor emisor incidan en la muestra bajo estudio y se reflejen en dicha muestra, llegando hasta el transductor receptor, y donde las direcciones de la onda emitida y de la onda recibida forman un ángulo entre sí. Dicho ángulo formado por las ondas emitida y recibida es, preferentemente, inferior a 180°, y más preferentemente, está comprendido entre 175° y 5°.

d) Un generador de señales de onda de ultrasonidos conectado al transductor emisor.

e) Un medio de análisis de las señales de onda emitida y recibida, respectivamente, por los transductores emisor y receptor que comprende medios programables para la comparación y/o el análisis de dichas señales de onda.

50 Se consigue con ello una herramienta capaz de monitorizar muestras delgadas de cultivos biológicos (con grosores del orden de 2 μ m - 2 mm) tanto en tiempo real como off-line (esto es, teniendo lugar la detección de la

señal y su análisis en tiempos diferentes), que permite una caracterización precisa de las propiedades mecánicas y geométricas.

5 En una realización preferente de la invención, el dispositivo está equipado con un conversor analógico/digital (A/D) conectado al transductor receptor. Se consigue con ello registrar los datos del pulso de onda emitido a través de la muestra para su posterior análisis digital.

En otra realización preferente de la invención, el conversor A/D está sincronizado con el generador de señales de onda. Se consigue con ello poder analizar y comparar la señal de onda de ultrasonidos antes y después de su paso por la muestra.

10 En otra realización de la invención, el transductor emisor y/o el transductor receptor de la señal de onda están conectados a, al menos, un amplificador de dicha señal. Se consigue con ello una señal aún más nítida para su detección y análisis.

En una realización preferida de la invención, el generador de señales de onda genera una señal igual o superior a 1 MHz. Se consiguen con ello señales particularmente adecuadas para el análisis de muestras delgadas, entre 2 μm y 2 mm.

15 En una realización alternativa de la invención, los transductores comprenden una frecuencia de resonancia comprendida entre 1 MHz y 200 MHz. Se consigue con ello frecuencias de longitud de onda comparable al grosor de las muestras estudiadas.

20 En una realización más de la invención, la placa de cultivo está fabricada con un material óptica y/o acústicamente transparente. Se consigue con ello una reducción de los fenómenos de reflexión y refracción óptica/acústica en el interior de la placa.

En una realización preferente de la invención, el medio de análisis es un ordenador conectado a Internet. Se consigue con ello una herramienta adecuada para el análisis de grandes muestras de datos, capaz de almacenar y/o compartir los resultados obtenidos con equipos remotos

25 En una nueva realización de la invención, la muestra bajo estudio es un cultivo tisular o un cultivo celular. Se consigue con ello un dispositivo aplicable al campo de la medicina y a la biomecánica.

En una realización aún más preferida de la invención, el cultivo tisular o celular está embebido en un fluido bio-compatibles, o "simulated body fluid" (SBF). Se consigue con ello que el dispositivo permita estudiar las muestras en condiciones biológicas óptimas, sin que se produzca desnaturalización de las mismas.

30 En otra realización preferente de la invención, el dispositivo de monitorización comprende, adicionalmente, una tapa superior de un material óptica y/o acústicamente transparente por encima de la muestra bajo estudio, manteniendo una separación controlada entre la placa de cultivo y dicha tapa superior. Se consigue con ello fijar el grosor de la muestra a un valor predeterminado.

35 En una realización adicional de la presente invención, el dispositivo de monitorización comprende una capa acústicamente transparente deslizante entre los transductores y la placa de cultivo, configurada dicha capa para permitir el movimiento de la pareja de transductores, sin movimiento relativo entre ellos, respecto a la placa de monitorización. Con ello se consigue modificar los puntos de medición sobre la muestra bajo estudio, permitiendo la posibilidad de hacer un muestreo a lo largo de su superficie con el que obtener diagramas en dos dimensiones de la distribución espacial de las medidas realizadas y, en consecuencia, de los parámetros mecánicos y/o geométricos calculados.

40 Otro objeto de la presente invención es un método de monitorización de una muestra bajo estudio que comprende el uso de un dispositivo de monitorización según la presente invención.

45 En una realización del método de la invención, a través de los medios programables comprendidos en el medio de análisis de las señales de onda emitida y/o recibida, se calculan uno o más de los siguientes parámetros de la muestra bajo estudio: módulo de compresibilidad, módulo de cizalladura, módulo de Young, coeficiente de Poisson, coeficiente de reflexión, coeficiente de transmisión, impedancia acústica, atenuación, variación del grosor de la muestra, tiempo de retardo, viscosidad, atenuación de Rayleigh, atenuación histerética. Se consigue con ello un método capaz de obtener toda la información necesaria habitualmente considerada en el estado de la técnica para la más completa caracterización mecánica y/o geométrica de muestras bajo estudio.

50 Otras características y ventajas de la invención se desprenderán de la descripción que sigue, así como de las figuras que acompañan al presente documento.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un esquema de bloques de una realización del dispositivo de la invención, mostrando sus principales elementos.

5 La Figura 2 muestra una gráfica en la que se representa la amplitud de la señal (en mV) del pulso de onda recibido por el transductor receptor a su paso a través de la muestra en función del tiempo (en μ s) y digitalizada por el conversor A/D, en una realización preferente de la invención.

La Figura 3 muestra una gráfica en la que se representa la amplitud de la señal (en mV) del pulso de onda recibido por el transductor receptor antes de situar la muestra en la placa en función del tiempo (en μ s) y digitalizada por el conversor A/D, en una realización preferente de la invención.

10 La Figura 4 muestra una gráfica en la que se representa el tiempo de retardo (en ns, en trazo discontinuo) definido como el lapso entre picos negativos consecutivos de la señal de ultrasonidos junto al tiempo de llegada (en ns, trazo continuo) del primer pico negativo al detector, en función del tiempo de reacción del cultivo monitorizado (en s), en una realización de la invención.

15 La Figura 5 muestra una gráfica en la que se representa la amplitud normalizada del primer pico negativo del pulso de ultrasonidos (trazo continuo) y de la atenuación de la señal (trazo discontinuo), en función del tiempo de reacción del cultivo monitorizado (en s), en una realización de la invención.

La Figura 6 muestra una gráfica en la que se representa la evolución, en tanto por ciento, de cinco parámetros mecánicos (módulo de compresibilidad, atenuación viscosa, atenuación histerética, corrección de la amplitud de excitación, corrección de la temperatura), en función del tiempo de reacción del cultivo monitorizado (en s), en una realización de la invención.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal y como se muestra en la Figura 1 que acompaña a este documento, el dispositivo de monitorización de la invención comprende los siguientes elementos:

25 - Placa de cultivo (1): consiste en una placa de cultivo tipo Petri destinada a alojar la muestra (2) bajo estudio. La geometría de la placa puede ser variable (redonda, cuadrada, etc.), y está fabricada, preferentemente, en un material transparente (tanto óptica como acústicamente), por ejemplo, en polimetilmetacrilato (PMMA), aunque otro tipo de materiales, plásticos o vidrios, de entre los habitualmente empleados en el estado de la técnica pueden ser igualmente utilizados. La placa comprende una superficie inferior interna, preferentemente horizontal, sobre la que reposa la muestra (2), y una o más paredes con altura suficiente para alojar dicha muestra (2) junto con un fluido en la que ésta es embebida. Para una realización de la invención en la que la muestra (2) bajo estudio es un cultivo tisular o un cultivo celular, el fluido en el que se embebe es, preferentemente, un fluido bio-compatibile (es decir, que no resulta perjudicial para las células del cultivo estudiado y que permite la realización de sus funciones biológicas), también denominado "simulated body fluid" (SBF) (3). Para otra realización preferente de la invención, el SBF puede ser sustituido por una tapa superior de PMMA (o un material equivalente que sea óptica y/o acústicamente transparente) por encima de la muestra (2) bajo estudio, con el objeto de fijar un espesor predeterminado de la misma, mediante una separación controlada entre la placa de cultivo (1) y la tapa superior. También es posible, en una realización adicional, disponer una tapa superior de PMMA (o un material equivalente) sobre la muestra (2) bajo estudio embebida en el SBF.

40 - Transductores de ultrasonidos (4, 5): Para la monitorización de la muestra (2) bajo estudio mediante ultrasonidos, el dispositivo de la invención comprende una pareja de transductores, emisor (4) y receptor (5), capaces, respectivamente, de emitir y recibir pulsos de ondas de ultrasonidos a través de la placa de cultivo (1), de la muestra (2) bajo estudio y/o del SBF (3). Preferentemente, los transductores se sitúan acoplados a la zona inferior externa de la placa de cultivo (1), formando un ángulo entre sí inferior a 180° (donde 180° correspondería a una posición en la que ambos transductores (4, 5) permanecen enfrentados entre sí, y paralelos a la superficie horizontal de la muestra (2) bajo estudio) y, más preferentemente, el ángulo que forman los transductores (4, 5) entre sí está comprendido entre 175° y 5°. La configuración en ángulo de los transductores permite una mayor discriminación de las propiedades mecánicas estudiadas en la muestra (2), ya que el ángulo de refracción (ley de Snell) de las ondas propagadas a través de la muestra (2) se ve modificado en función de dichas propiedades mecánicas. Además, la separación de trayectorias permite una mayor discriminación entre los fenómenos de propagación e interacción de los pulsos de onda transmitidos. Por último, emplear una configuración con dos transductores separados, en lugar de, por ejemplo, una configuración basada en un único transductor que funciona como emisor y receptor, permite reducir la interferencia electrónica y ultrasónica de los pulsos de onda transmitidos.

55 Otra ventaja añadida de la configuración de los transductores en la presente invención, viene dada por su localización en la región inferior de la placa de cultivo (1) y de su posición relativa en ángulo, lo que proporciona un acceso total a la muestra (2) desde la zona superior para su manipulación o sustitución, sin la necesidad de desmontar el dispositivo. Esto permite optimizar los tiempos de laboratorio y aumentar el rendimiento del dispositivo.

Preferentemente, los transductores emisor (4) y receptor (5) son transductores idénticos de tipo piezoeléctrico, aunque otro tipo de modelos con idéntica funcionalidad (por ejemplo, transductores de tipo magnetostrictivo) resultan igualmente utilizables. Para las distintas realizaciones de la invención, la longitud de onda asociada a la frecuencia de resonancia de los transductores (4, 5) ha de resultar adecuada (y por tanto, comparable) a las longitudes de onda correspondientes a la muestra (2) a analizar. En una realización preferente de la invención en la que la muestra bajo estudio es un cultivo tisular o un cultivo celular, la frecuencia de resonancia de los transductores (4, 5) está comprendida entre 1 MHz y 200 MHz.

En una realización adicional de la presente invención, es posible mantener los transductores (4, 5) separados de la placa de cultivo (1), preferentemente sin modificar su configuración formando un ángulo entre sí, introduciendo una capa intermedia deslizante, preferentemente que comprende un fluido acústicamente transparente (por ejemplo, agua desgasificada), de modo que se permita un movimiento de la pareja de transductores (4, 5), sin movimiento relativo entre ellos, respecto a la placa de monitorización (1), con el fin de modificar los puntos de medición sobre la muestra (2) bajo estudio, permitiendo la posibilidad de hacer un muestreo a lo largo de su superficie con el que obtener diagramas en dos dimensiones de la distribución espacial de las medidas realizadas y, en consecuencia, de los parámetros mecánicos calculados.

- Generador de pulsos de onda (6): Consiste en un generador conectado al transductor emisor (4), capaz de generar un ciclo (o "burst") de ondas sinusoidales de frecuencia preferentemente igual o superior a 1 MHz, con pausa variable comprendida entre 10 microsegundos y 100 milisegundos), de frecuencia acorde con la frecuencia de resonancia de los transductores (4, 5) y adecuada a las longitudes de onda correspondientes a la muestra (2) bajo estudio. Preferentemente, la amplitud del pulso de onda generado por el generador (6) comprende una amplitud entre 1 y 400 voltios pico-pico (Vpp). En otras realizaciones de la invención, también es posible emplear un pulso de ondas de emisión y recepción continua, en lugar de mediante "bursts", con el objetivo, por ejemplo, de estudiar fenómenos de resonancia.

- Amplificadores (7, 8) de la señal generada y recibida: Es posible, cuando las condiciones del experimento así lo requieren, dotar al dispositivo de la presente invención de uno o más amplificadores, tanto de la señal generada por el generador de pulsos de onda (6) como de la señal recibida por el transductor receptor (5).

- Conversor analógico-digital (A/D) (9): En distintas realizaciones de la invención, con el fin de analizar las muestras (2) mediante, por ejemplo, un ordenador, se emplea un aparato conversor para convertir la señal analógica en una señal digital, preferentemente con una frecuencia de muestreo de, al menos, el doble de la de transmisión y con una memoria de muestreo de, al menos, 1000 muestras. Asimismo, para obtener una señal que permita un análisis detallado de la muestra (2) estudiada, la profundidad de muestreo del conversor (9) es de, preferentemente, al menos 8 bits. Para facilitar el análisis de la señal recibida, el conversor A/D está sincronizado con el generador de pulsos de onda (6).

- Medio de análisis de las señales de onda (10): Comprende los medios programables configurados como hardware/software que permiten procesar, analizar y almacenar los datos sobre los pulsos de onda emitidos y recibidos de las muestras generadas por el conversor A/D (9), ya sea en tiempo real o bien "off-line". En una realización preferente de la invención, el medio de análisis de las señales de onda (10) es un ordenador, y más preferentemente comprende una conexión a Internet (11), lo que permite analizar y almacenar los datos de forma remota, así como compartirlos con múltiples usuarios.

Ejemplo de una realización preferente de la invención:

Para una realización de la invención en la que la muestra (2) bajo estudio es un cultivo tisular, se dispone una capa de dicho cultivo con un grosor de 100 μm sobre la placa (1) con el cultivo (2). La capa dispuesta sufre un proceso de gelificación durante un periodo de tiempo de, aproximadamente, una hora (es posible también que una parte de la muestra se evapore durante el proceso de gelificación). Para la monitorización del cultivo (2), se emplea un montaje según el dispositivo de la Figura 1, equipado con dos transductores (un emisor (4) y un receptor (5)) con frecuencia de resonancia de 20 MHz. La señal de ondas generada por el generador de pulsos (6) interacciona con el cultivo (2) alojado en la placa (1), y el pulso de onda resultante es detectado por el transductor receptor (5). La señal detectada es amplificada por un amplificador (8) conectado al transductor receptor (5) y digitalizada mediante un conversor A/D (9) sincronizado con el generador de ondas (6), y los datos generados por el conversor A/D son procesados off-line mediante un ordenador (10) que comprende un software programable para su análisis (por ejemplo, mediante software tipo MATLABTM, desarrollado por Mathworks).

La señal transmitida a través del cultivo (2) monitorizado se genera en el generador (6) como un pulso "burst" de un ciclo sinusoidal de 20 MHz de frecuencia y una amplitud pico-pico de 5V, con una tasa de repetición de 1 ms. El registro de datos es digitalizado con una base de 10 V, tras una preamplificación de 40 dB, durante un periodo de 5 μs y una tasa de muestreo de 400 MHz. Con el objetivo de reducir el ruido en 24 dB, se realiza un promedio de los datos registrados en grupos de 300 muestras.

Para caracterizar las propiedades de la onda ultrasónica a lo largo del material de la placa de cultivo (1) (PMMA) y de la muestra (2) bajo estudio (el cultivo gelificado), se registran los datos de los "bursts" de onda con y

5 sin la presencia de la muestra bajo estudio (Figuras 2 y 3). En dichas figuras puede verse cómo, cuando la muestra está presente, la mayor parte de la señal generada se transmite hasta el receptor, en lugar de ser reflejada. Cuando un pulso de onda cruza de un medio a otro (en este caso, del PMMA al gel del cultivo), se producen fenómenos de reflexión y transmisión caracterizados físicamente por los coeficientes de reflexión y transmisión (R y D , respectivamente):

$$R = \left[\frac{Z_1 - Z_2}{Z_1 + Z_2} \right]^2 \quad D = \frac{4Z_1Z_2}{[Z_1 + Z_2]^2} \quad (1)$$

10 donde $Z_{1,2}$ corresponde al valor de las impedancias acústicas $Z_{1,2} = \rho_{1,2} \cdot c_{p(1,2)}$ en cada medio (con ρ siendo la densidad del medio y c_p siendo la velocidad de propagación de la onda en dicho medio). Adicionalmente, el ángulo de propagación de los frentes de onda se ve modificado siguiendo la ley de Snell, $\sin(\theta_1)/c_{p(1)} = \sin(\theta_2)/c_{p(2)}$, donde θ es el ángulo de incidencia sobre el medio. Para el presente ejemplo de una realización preferente de la invención, los valores de los coeficientes R y D obtenidos son $R=0,36^2$, $D=0,93^2$. Adicionalmente, dado que la longitud de onda en el gel $\lambda = c_p/f$ (donde λ es la longitud de onda y f es la frecuencia de ultrasonidos empleada) es igual a $74 \mu\text{m}$ y, en consecuencia, comparable al grosor de la capa de gel depositada en la placa (1), es posible también analizar separadamente los ecos individuales de la señal mediante el procesamiento de la señal transmitida.

20 Mediante el análisis de la señal transmitida a través del cultivo estudiado, el dispositivo de la presente invención permite, también, analizar la distancia entre picos negativos consecutivos (a lo que se llama "retardo de eco" o "echo delay"), lo que permite calcular las variaciones de grosor de la muestra (2) durante la gelificación o los módulos de compresibilidad y/o cizalladura del gel (Figura 4). Adicionalmente, es posible analizar el tiempo de llegada del primer pico negativo (Figura 4) a lo largo del proceso de gelificación.

25 En la Figura 5 se muestra la amplitud normalizada del primer pico negativo, cuya variación se relaciona con la variación de la impedancia acústica del gel (dependiente de los módulos de compresibilidad y cizalladura), lo que resulta en la variación de los coeficientes de reflexión y transmisión. Por otra parte, la atenuación de la señal se calcula dividiendo las amplitudes entre dos picos negativos consecutivos, y se relaciona con las propiedades de absorción del gel, relacionadas con sus características viscoelásticas y dispersivas, o incluso con la microestructura heterogénea del gel a la escala de $1-10 \mu\text{m}$.

30 De este modo, como se ha descrito, es posible, mediante la presente invención, configurar los medios programables del medio de análisis (10) del dispositivo para analizar los pulsos de onda emitidos y recibidos por los transductores (4, 5), pudiendo a través de dichos medios obtener medidas de las características mecánicas de la muestra (2) típicas en el estado de la técnica, tales como el módulo de compresibilidad o cizalladura (a través de la medición de la distancia entre picos negativos consecutivos), el módulo de Young (relacionado con el módulo de compresibilidad), el coeficiente de Poisson (relacionado con el módulo de Young y con la velocidad de propagación de la señal a través de la muestra), los coeficientes de reflexión y de transmisión (relacionados con la impedancia acústica del gel), la viscosidad, la atenuación de Rayleigh (caracterizada por la masa y la rigidez de la muestra) o la atenuación histerética (causada por la fricción entre los planos internos que se deslizan ante la deformación de la muestra), entre otros.

40 En la figura 6 se representa, para la realización preferente descrita en el presente ejemplo, la evolución de algunos de los parámetros mecánicos (P1, P2, P3, P4, P5) medidos a través del dispositivo de monitorización. Más concretamente, se representa la variación, en tanto por ciento, a lo largo del proceso de gelificación de los valores iniciales del módulo de compresibilidad (P1) ($K=2,2455 \text{ GPa}$), de la atenuación viscosa (P2) ($D_v=6,7483 \cdot 10^{-10}$), atenuación histerética (P3) ($D_h=-0,10598$), de la corrección de la amplitud de de la señal de excitación normalizada (P4) y de la corrección del módulo de compresibilidad normalizado a causa de la temperatura (P5), en función del tiempo de reacción del cultivo monitorizado (en s).

45 Por último, una vez descrita la presente invención y algunas de sus realizaciones preferentes, junto con sus principales ventajas sobre el estado de la técnica, cabe resaltar que su aplicación no ha de ser entendida como limitativa frente a otras realizaciones, mediante las adecuadas variaciones en sus elementos, siempre que dichas variaciones no alteren la esencia de la invención, así como el objeto de la misma.

REIVINDICACIONES

- 1.- Dispositivo de monitorización de muestras (2) bajo estudio caracterizado porque comprende:
- a) Una placa de cultivo (1) configurada para alojar la muestra (2);
- 5 b) Un transductor emisor (4) de señales de onda de ultrasonidos hacia la muestra (2), acoplado a la placa de cultivo (1) en la región inferior de dicha placa (1);
- c) Un transductor receptor (5) de las señales de onda de ultrasonidos transmitidas a través de la muestra (2), acoplado a la placa de cultivo (1) en la región inferior de dicha placa (1), situado de forma que las señales de onda emitidas por el transductor emisor (4) incidan en la muestra bajo estudio y se reflejen en dicha muestra, llegando hasta el transductor receptor (5), y donde las direcciones de la onda emitida y de la onda recibida forman un ángulo entre sí;
- 10 d) Un generador (6) de señales de onda de ultrasonidos conectado al transductor emisor (4);
- e) Un medio de análisis (10) de las señales de onda emitida y recibida por los transductores emisor y receptor que comprende medios programables para la comparación y/o el análisis de dichas señales de onda.
- 2.- Dispositivo según la reivindicación 1 que comprende un conversor A/D (9) conectado al transductor receptor (5).
- 15 3.- Dispositivo según la reivindicación 2, donde el conversor A/D (9) está sincronizado con el generador (6) de señales de onda.
- 4.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el transductor emisor (4) y/o el transductor receptor (5) de la señal de onda están conectados a, al menos, un amplificador (7, 8) de dicha señal.
- 20 5.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el generador (6) de señales de onda genera una señal igual o superior a 1 MHz.
- 6.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde los transductores (4, 5) comprenden una frecuencia de resonancia comprendida entre 1 MHz y 200 MHz.
- 7.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la placa de cultivo (1) está fabricada con un material óptica y/o acústicamente transparente.
- 25 8.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el medio de análisis (10) es un ordenador conectado a Internet.
- 9.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la muestra (2) bajo estudio posee un grosor comprendido entre 2 μ m y 2 mm.
- 30 10.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la muestra (2) bajo estudio es un cultivo celular.
- 11.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la muestra (2) bajo estudio es un cultivo tisular.
- 12.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, donde el cultivo está embebido en un fluido bio-compatibile (3).
- 35 13.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, que comprende una tapa superior de un material óptica y/o acústicamente transparente situada sobre la muestra (2) bajo estudio, mantenida dicha tapa superior a una separación controlada con la placa de cultivo (1).
- 14.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende una capa acústicamente transparente y deslizante entre los transductores (4, 5) y la placa de cultivo (1), configurada para permitir el movimiento de dichos transductores (4, 5), sin movimiento relativo entre ellos, respecto a la placa de monitorización (1).
- 40 15.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde el ángulo que forma el transductor emisor (4) con el transductor receptor (5) es inferior a 180°.
- 16.- Dispositivo según la reivindicación 15, donde el ángulo que forma el transductor emisor (4) con el transductor receptor (5) está comprendido entre 175° y 5°.
- 45 17.- Método de monitorización de una muestra (2) bajo estudio que comprende el uso de un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-16.

18.- Método según la reivindicación 17 donde, a través de los medios programables comprendidos en el medio de análisis (10) de las señales de onda emitida y/o recibida, se calculan uno o más de los siguientes parámetros de la muestra bajo estudio: módulo de compresibilidad, módulo de cizalladura, módulo de Young, coeficiente de Poisson, coeficiente de reflexión, coeficiente de transmisión, impedancia acústica, atenuación, variación del grosor de la muestra, tiempo de retardo, viscosidad, atenuación de Rayleigh, atenuación histerética.

5

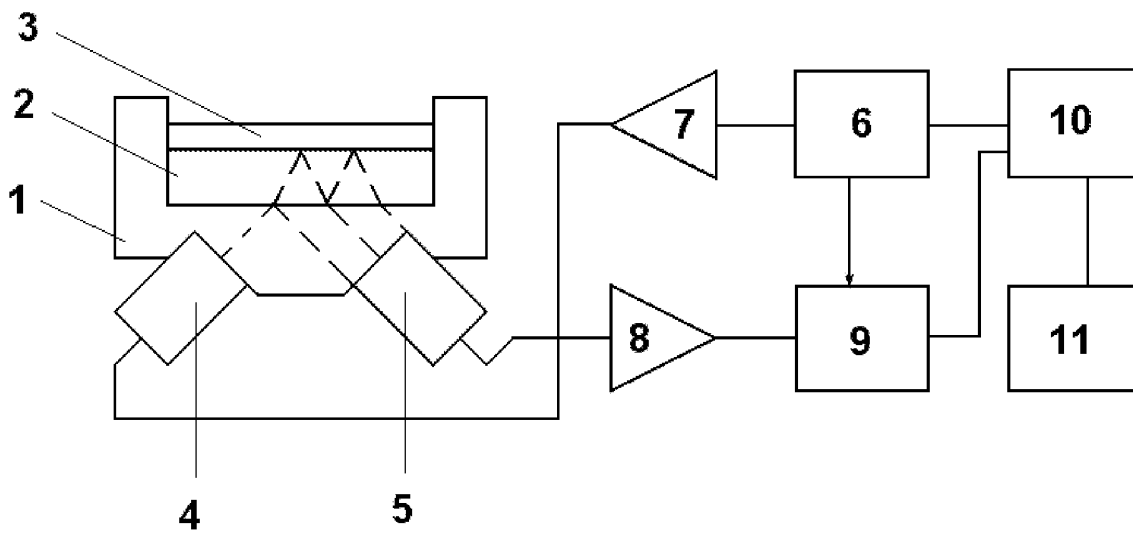


FIG. 1

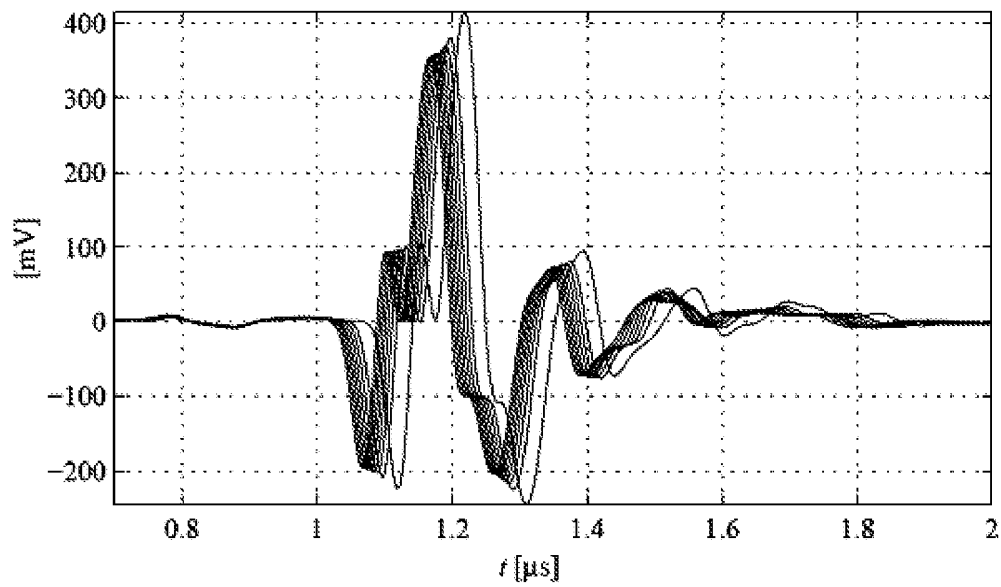


FIG. 2

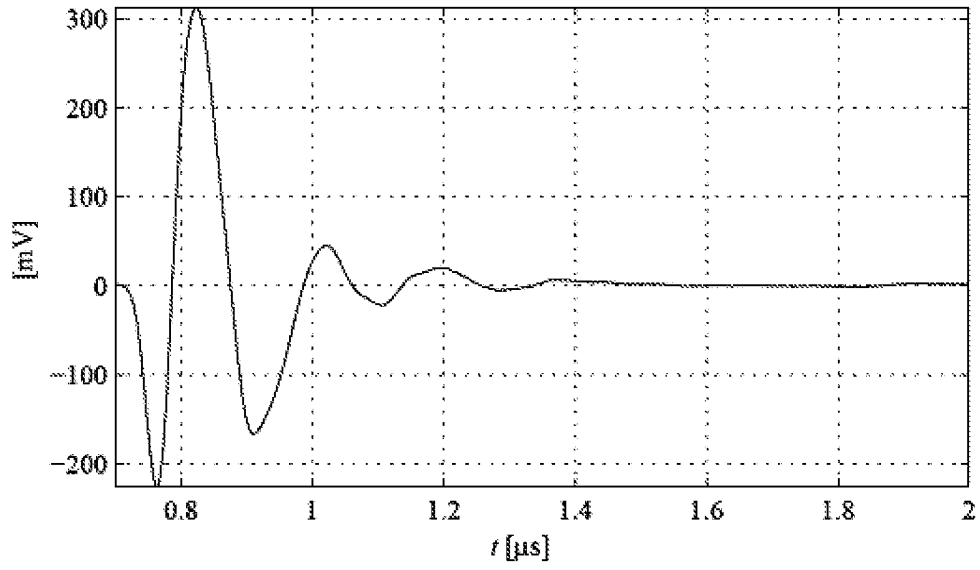


FIG. 3

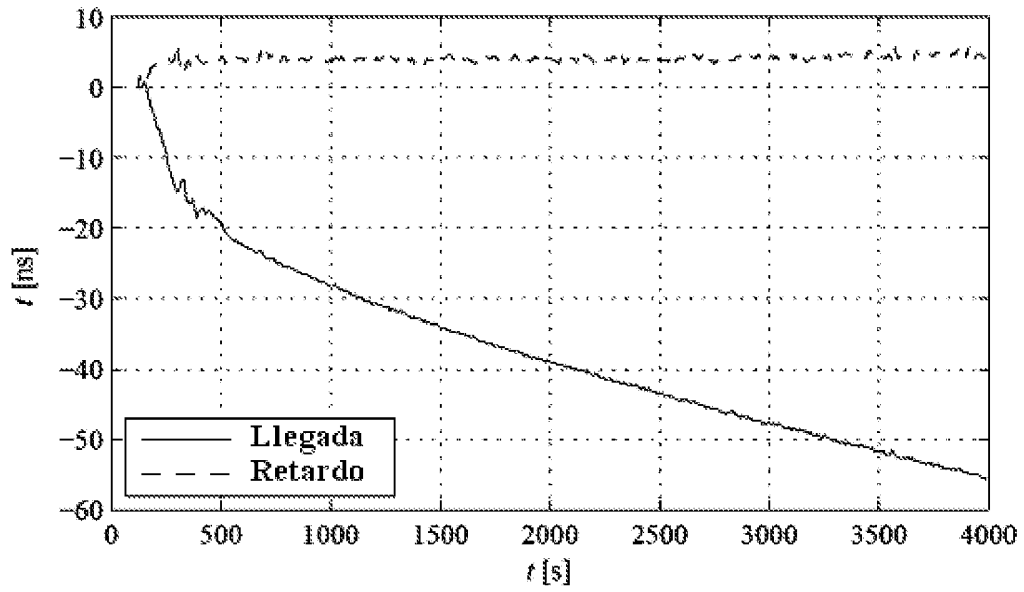


FIG. 4

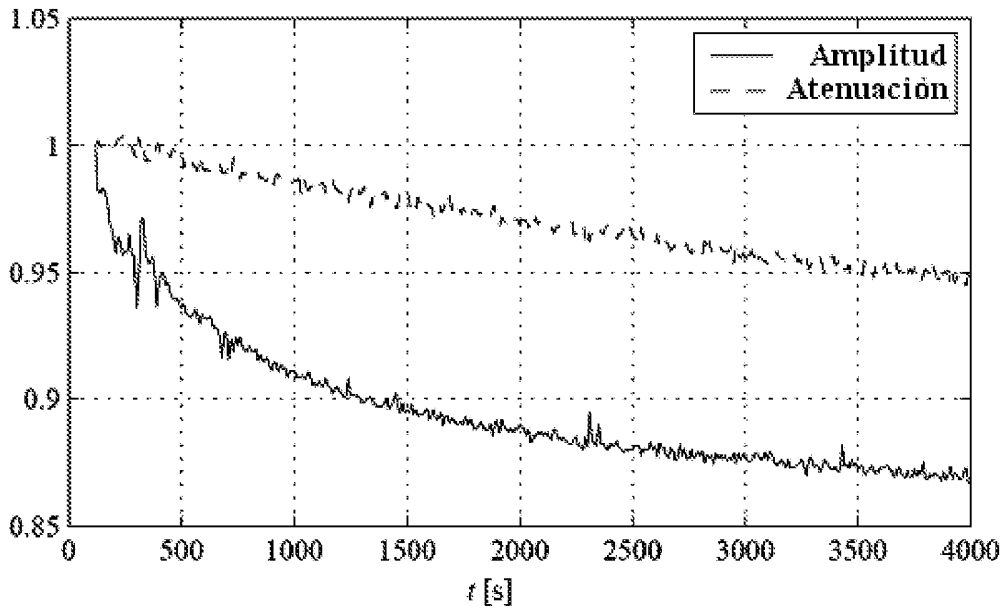


FIG. 5

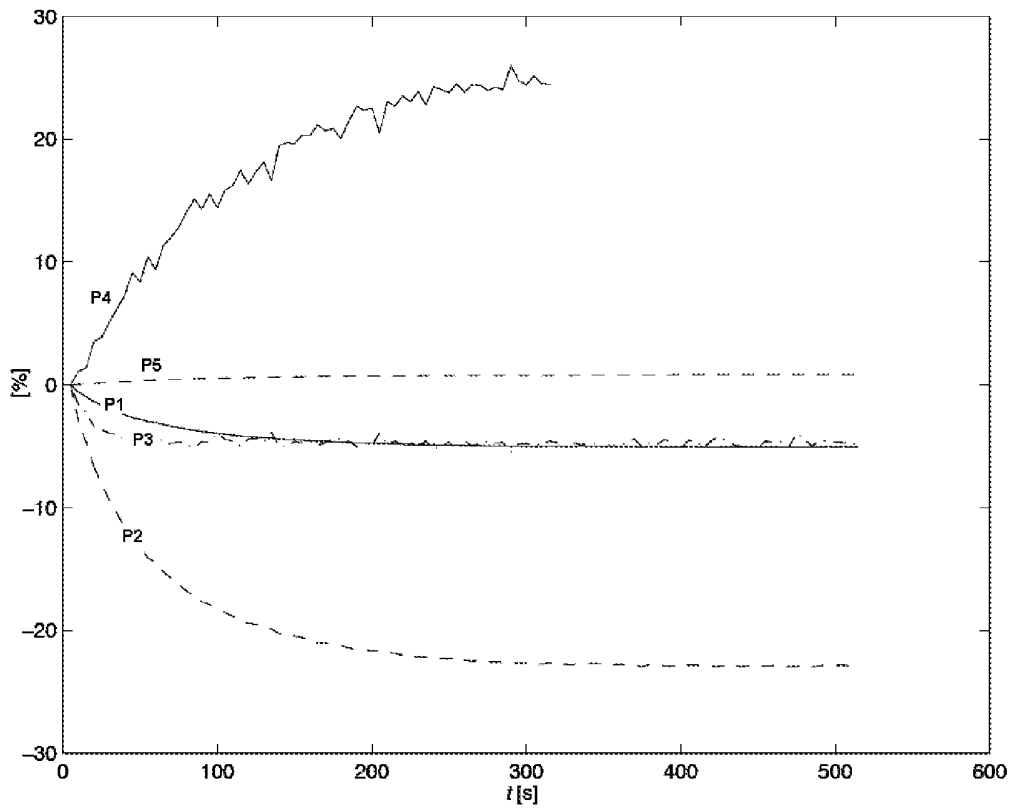


FIG. 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201130299

22 Fecha de presentación de la solicitud: 04.03.2011

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl. : **G01N29/00** (2006.01)
G01N33/483 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2010206079 A1 (VLAHOPOULOU J.) 19.08.2010, figura 1; párrafos 15-17,19-34,63-66.	1-18
A	US 2009158822 A1 (SUN et al.) 25.06.2009, párrafos 6,7,25-54,76; reivindicaciones 1-24.	1-18
A	DE 102004015830 A1 (TF INSTRUMENTS GMBH) 03.11.2005, resumen; párrafos 6,7,36.	1-18
A	DOYLE T. et al. "Ultrasonic differentiation of normal versus malignant breast epithelial cells in monolayer cultures", The Journal of the Acoustical Society of America, noviembre 2010, vol. 128, nº 5, páginas EL229-EL235.	1-18
A	Base de datos INSPEC/IEE, AN 8268471, BADDOUR R E et al. "High-frequency ultrasound scattering from microspheres and single cells", resumen, Journal of the Acoustical Society of America, febrero 2005.	1,9-12,17,18
A	Base de datos INSPEC/IEE, AN 8268471, DUKHIN et al. "Ultrasonic characterization of proteins and bloodcells", resumen, Colloids and Surfaces B (Biointerfaces), diciembre 2006.	1,9-12,17,18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
04.07.2012

Examinador
A. Cárdenas Villar

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, INSPEC, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.07.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1 - 18	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1 - 18	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2010206079 A1 (VLAHOPOULOU J.)	19.08.2010
D02	US 2009158822 A1 (SUN et al.)	25.06.2009
D03	DE 102004015830 A1 (TF INSTRUMENTS GMBH)	03.11.2005
D04	DOYLE T. et al. "Ultrasonic differentiation of normal versus malignant breast epithelial cells in monolayer cultures", The Journal of the Acoustical Society of America, noviembre 2010, vol. 128, nº 5, páginas EL229-EL235.	11.2010
D05	Base de datos INSPEC/IEE, AN 8268471, BADDOUR R E et al. "High-frequency ultrasound scattering from microspheres and single cells", resumen, Journal of the Acoustical Society of America, febrero 2005.	02.2005
D06	Base de datos INSPEC/IEE, AN 8268471, DUKHIN et al. "Ultrasonic characterization of proteins and bloodcells", resumen, Colloids and Surfaces B (Biointerfaces), diciembre 2006.	12.2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente en estudio tiene una reivindicación independiente, la nº 1, que se refiere a un dispositivo de monitorización de muestras que comprende una placa de cultivo, un generador de ultrasonidos, un emisor, un receptor y un medio de análisis.

Las reivindicaciones dependientes 2 - 8, 13 - 16 se refieren a los componentes adicionales y a las características de los componentes principales del sistema y a su disposición. Las reivindicaciones 9 - 12 se ocupan del tipo de cultivo y las reivindicaciones 17 y 18 del método que utiliza el dispositivo.

Tal y como aparecen redactadas actualmente las reivindicaciones podemos considerar al documento D01 como el más próximo en el estado de la técnica.

En dicho documento se describe un método y un dispositivo para la monitorización de cultivos biológicos por medio de ultrasonidos que está compuesto principalmente de un generador, un amplificador y un transmisor para la generación de señales de ultrasonidos, un elemento receptor, componentes de acondicionamiento de la señal recibida y medios de almacenamiento y análisis de la señal incluidos en un ordenador programable (ver por ej. la figura 1 y los párrafos 63 - 66). En este documento encontramos un método que utiliza el paso de ondas de ultrasonido a través del cultivo microbiológico para la monitorización de los estados de dicho cultivo, incluyendo, entre otros, velocidad de crecimiento, daño celular y viabilidad, determinando la atenuación que experimenta la onda al atravesar el cultivo y calculando la viscosidad efectiva (ver por ej. párrafos 15 - 17). En este documento también se recogen características de otros componentes adicionales del dispositivo.

Siguiendo la redacción de la reivindicación independiente el dispositivo reivindicado en la solicitud en estudio se diferencia del citado documento en que se refiere a un cultivo en placa y a la disposición de los elementos emisor y receptor, características que le aportan novedad pero que, tal y como aparecen redactadas actualmente las reivindicaciones, no le confieren actividad inventiva según lo especificado en los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

Por otro lado los documentos citados D02 - D06 reflejan diferentes aspectos del estado de la técnica.