(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 808 403**

(51) Int. CI.:

G01N 1/28 (2006.01)
G01N 35/10 (2006.01)
G01C 3/06 (2006.01)
G06T 7/00 (2007.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2013 PCT/US2013/050519**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14012100**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2013 E 13742342 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 2872869**

(54) Título: **Distribución controlada de muestras sobre sustratos**

(30) Prioridad:

13.07.2012 US 201261671600 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2021

(73) Titular/es:

ROCHE DIAGNOSTICS HEMATOLOGY, INC. (100.0%)
9115 Hague Rd.
Indianapolis IN 46250, US

(72) Inventor/es:

ZAHNISER, RUSSELL;
ZAHNISER, DAVID;
CONROY, STEPHEN y
ZAHNISER, MICHAEL

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

DESCRIPCIÓN

Distribución controlada de muestras sobre sustratos

CAMPO TÉCNICO

La presente divulgación se refiere a procedimientos y sistemas para la distribución controlada de muestras líquidas sobre sustratos.

ANTECEDENTES

Los procedimientos convencionales para analizar muestras biológicas, tales como sangre o líquidos corporales, típicamente incluyen dos etapas. En primer lugar, un sistema automatizado realiza un análisis cuantitativo de las características de la muestra sobre la muestra en estado líquido. Por ejemplo, un citómetro de flujo que usa mediciones de impedancia, fluorescencia y/o basadas en luz dispersa procesa una muestra de sangre suspendida en un vapor líquido para contar glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, y para derivar otros parámetros de un hemograma completo. En segundo lugar, en la medida en que el sistema de flujo detecta cualquier anomalía en la muestra (por ejemplo, un recuento de glóbulos blancos alto de forma anómala), el sistema marca la muestra y un técnico de laboratorio revisa la muestra manualmente examinando una preparación seca y teñida de la muestra en un portaobjetos.

Para facilitar la revisión manual, el técnico típicamente prepara un frotis "en cuña" de la muestra de sangre. Las preparaciones de frotis proporcionan muestras con grosores y distribución altamente variables de los componentes sanguíneos. El frotis en cuña a menudo solo tiene una banda estrecha individual con una densidad celular apropiada para el examen y análisis, y la localización y la conformación de esta banda varía de un portaobjetos a otro. Además, debido a una falta de uniformidad, las preparaciones de frotis a menudo impiden la cuantificación absoluta de las propiedades de la muestra para un paciente dado. En general, solo se pueden evaluar proporciones relativas dentro del propio frotis.

Un procedimiento de preparación de muestras que produce una muestra uniforme de alta calidad haría que la evaluación visual de la muestra fuera tanto más fácil como más exacta. Además, para las muestras preparadas usando un volumen conocido de la muestra de una manera altamente invariable, es posible automatizar la cuantificación de las propiedades de la muestra directamente desde la muestra, reemplazando la primera etapa del análisis de la muestra realizada tradicionalmente usando sistemas basados en flujo. La solicitud de patente de EE. UU. publicada n.º US 2006/0144331 A1 divulga un procedimiento y un dispositivo para dividir una muestra o reactivo en un objeto. Cuando una sección de especificación de posición de división especifica una posición de división en un objeto de acuerdo con una imagen del objeto tal como una membrana mostrada en una sección de monitor, una sección de control de división realiza un posicionamiento relativo entre el objeto y un elemento de división de modo que la posición de división especificada en el objeto está debajo del elemento de división y controla el funcionamiento de división. Una sección de generación de información de posición de división puede generar información de posición de división en la posición de división en el objeto especificado por la sección de especificación de posición de división y sujeto a división y salida hacia afuera.

SUMARIO

Los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento se usan durante la preparación de muestras automatizada en la que se usan aplicadores de muestras para distribuir muestras de líquido sobre sustratos tales como portaobjetos de manera cuidadosamente controlada. La distribución con éxito de líquidos para obtener muestras de distribución relativamente uniforme por todo un sustrato depende, en parte, de controlar la posición del aplicador de muestras con respecto a la superficie del sustrato que recibe la muestra. Para lograr un control preciso sobre el aplicador de muestras, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento están configurados para determinar la posición del aplicador de muestras con respecto a la superficie del sustrato en base a una o más imágenes del aplicador, incluyendo las imágenes reflejadas desde la superficie del sustrato. La(s) imagen/imágenes incluyen tanto una región de imagen directa que corresponde a una imagen directa (por ejemplo, no reflejada) del aplicador de muestras por encima del sustrato como una primera región de imagen reflejada que corresponde a una imagen del aplicador de muestras que se refleja desde la superficie del sustrato.

La posición del aplicador con respecto a la superficie del sustrato se puede determinar en base a la distancia entre los bordes del aplicador de muestras en la región de imagen directa y la primera región de imagen reflejada. Los procedimientos y los sistemas que implementan los procedimientos se pueden extender para determinar la posición del aplicador de muestras en múltiples localizaciones transversales con respecto al sustrato. Determinando inicialmente un conjunto de posiciones adecuadas del aplicador con respecto a la superficie del sustrato (por ejemplo, en las esquinas del sustrato), se pueden interpolar señales de control adecuadas para producir las posiciones del aplicador deseadas en otras localizaciones en la superficie del sustrato. De esta manera, se puede lograr un control preciso sobre la posición del aplicador de muestras con respecto a la superficie del sustrato durante la distribución de una muestra de líquido sobre el sustrato.

En general, en un primer aspecto, la divulgación presenta procedimientos para preparar una muestra sobre un sustrato, incluyendo los procedimientos: (a) obtener una imagen de un aplicador de muestras cerca del sustrato, incluyendo la imagen una región de imagen directa correspondiente al aplicador de muestras y una primera región de imagen reflejada correspondiente a una imagen del aplicador de muestras reflejada desde una superficie del sustrato; (b) determinar una posición de un borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa; (c) determinar una posición de un borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada; (d) determinar una distancia entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras; (e) determinar la posición del aplicador de muestras con respecto al sustrato en base a la distancia entre los bordes; y (f) distribuir la muestra sobre el sustrato usando el aplicador de muestras, donde durante la distribución la posición del aplicador de muestras con respecto al sustrato se mantiene.

Los modos de realización de los procedimientos pueden incluir uno cualquiera o más de los siguientes rasgos característicos.

Los procedimientos pueden incluir trasladar el aplicador de muestras con respecto al sustrato durante la distribución. El aplicador de muestras se puede extender a lo largo de una dirección axial, y una superficie interna del aplicador de muestras se puede biselar en un ángulo con respecto a la dirección axial. El aplicador de muestras puede incluir un canal que tiene un diámetro interior de entre 300 micrómetros y 650 micrómetros. El aplicador de muestras puede incluir un miembro tubular hueco y un recubrimiento formado en una superficie externa del miembro tubular. El aplicador de muestras puede incluir una aguja.

El aplicador de muestras puede incluir un canal a través del que fluye la muestra, y el canal puede tener una conformación en sección transversal no circular. La conformación en sección transversal del canal puede ser ovalada.

El aplicador de muestras se puede trasladar con respecto al sustrato a una velocidad de entre 80 mm/s y 90 mm/s durante la distribución. La muestra se puede distribuir sobre el sustrato a una tasa de 0,05 µl/s o más. La muestra se puede distribuir sobre el sustrato en un patrón de filas adyacentes, donde una separación entre filas adyacentes durante la distribución está entre 0,20 mm y 0,60 mm.

La muestra puede incluir sangre y el sustrato puede ser un portaobjetos.

Los modos de realización de los procedimientos también pueden incluir otros rasgos característicos o etapas divulgados en el presente documento, en cualquier combinación, según sea apropiado.

En otro aspecto, la divulgación presenta sistemas que incluyen un aplicador de muestras y un procesador electrónico, donde el procesador electrónico está configurado para distribuir una muestra sobre un sustrato usando uno cualquiera de los procedimientos divulgados anteriormente y/o en cualquier otra parte en el presente documento. Los modos de realización de los sistemas pueden incluir cualquiera de los rasgos característicos divulgados en el presente documento, en cualquier combinación, según sea apropiado.

En otro aspecto, la divulgación presenta procedimientos para distribuir una muestra de líquido sobre un sustrato que incluye obtener una imagen de un aplicador de muestras cerca del sustrato, donde la imagen incluye una primera imagen del aplicador de muestras y una segunda imagen del aplicador de muestras, determinar una altura del aplicador de muestras con respecto a un plano de superficie del sustrato en base a una distancia entre las partes comunes de la primera y segunda imágenes, y distribuir la muestra de líquido sobre el sustrato usando el aplicador de muestras, donde la distribución incluye: trasladar el aplicador de muestras, trasladar el sustrato o trasladar tanto el aplicador de muestras como el sustrato para efectuar una traslación relativa entre el aplicador de muestras y el sustrato; y mantener el aplicador de muestras dentro de 2 micrómetros de una altura objetivo con respecto al plano de superficie del sustrato durante el traslado.

Los modos de realización de los procedimientos pueden incluir uno cualquiera o más de los siguientes rasgos característicos.

La primera imagen se puede localizar en una primera región de imagen de la imagen del aplicador de muestras, y la segunda imagen se puede localizar en una segunda región de imagen diferente de la primera región de imagen de la imagen del aplicador de muestras. La primera imagen puede ser una imagen directa del aplicador de muestras, y la segunda imagen puede ser una imagen del aplicador de muestras reflejada desde una superficie del sustrato.

La determinación de una altura del aplicador de muestras con respecto a un plano de superficie del sustrato puede incluir determinar una primera posición de un borde del aplicador de muestras en la primera imagen, determinar una segunda posición de un borde correspondiente del aplicador de muestras en la segunda imagen, y determinar la altura del aplicador de muestras en base a una diferencia entre la primera y segunda posiciones.

El sustrato puede incluir un portaobjetos, y la muestra de líquido puede ser sangre.

El sustrato puede tener una superficie rectangular formada por bordes largos y cortos ortogonales del sustrato, y los procedimientos pueden incluir distribuir una pluralidad de filas de la muestra de líquido sobre la superficie rectangular efectuando una traslación relativa entre el aplicador de muestras y el sustrato en una dirección paralela a los bordes largos de la superficie rectangular. El sustrato puede tener una superficie rectangular formada por bordes largos y cortos ortogonales del sustrato, y los procedimientos pueden incluir distribuir una pluralidad de filas de la muestra de líquido sobre la superficie rectangular efectuando una traslación relativa entre el aplicador de muestras y el sustrato en una dirección paralela a los bordes cortos de la superficie rectangular. El sustrato puede tener una superficie rectangular formada por bordes largos y cortos ortogonales del sustrato, y los procedimientos pueden incluir distribuir una pluralidad de filas de la muestra de líquido sobre la superficie rectangular efectuando una traslación relativa entre el aplicador de muestras y el sustrato en un ángulo tanto para los bordes largos como cortos de la superficie rectangular.

Trasladar el sustrato puede incluir trasladar una plataforma en la que se monta el sustrato mientras el aplicador de muestras permanece fijo en su posición.

La altura objetivo puede estar entre 9 micrómetros y 15 micrómetros.

La muestra de líquido puede incluir sangre. Los procedimientos pueden incluir obtener una imagen de glóbulos sanguíneos de la muestra de líquido en el sustrato, y evaluar al menos una de una distribución de los glóbulos sanguíneos en el sustrato y una uniformidad de tinción de los glóbulos sanguíneos en el sustrato. Los procedimientos pueden incluir ajustar un parámetro de funcionamiento de un sistema distribuidor de líquido que incluye el aplicador de muestras basado en al menos una de una distribución de los glóbulos sanguíneos en el sustrato y una uniformidad de tinción de los glóbulos sanguíneos en el sustrato. El parámetro de funcionamiento puede incluir al menos una de una tasa a la que se distribuye la muestra de líquido desde el aplicador de muestras, y una velocidad de traslación relativa entre el aplicador de muestras y el sustrato. La muestra de líquido se puede distribuir sobre el sustrato en una pluralidad de filas sucesivas, y el parámetro de funcionamiento puede incluir al menos uno de un espacio entre filas adyacentes de líquido y una longitud de las filas de líquido. El parámetro de funcionamiento puede incluir al menos una de una temperatura de la muestra de líquido y una humedad relativa dentro del sistema distribuidor de líquido.

Los procedimientos pueden incluir efectuar una velocidad de traslación relativa entre el aplicador de muestras y el sustrato de entre 40 mm/s y 90 mm/s para distribuir la muestra de líquido. Los procedimientos pueden incluir distribuir la muestra de líquido desde el aplicador de muestras a una tasa de entre 0,035 µl/s y 0,075 µl/s. Los procedimientos pueden incluir distribuir la muestra de líquido sobre el sustrato en una pluralidad de filas sucesivas, donde un espacio entre filas adyacentes está entre 0,20 mm y 0,60 mm.

Los procedimientos pueden incluir, antes de distribuir la muestra de líquido sobre el sustrato, obtener información sobre la composición de la muestra, obtener un conjunto de parámetros de funcionamiento predefinidos basados en la información y aplicar los parámetros de funcionamiento predefinidos para configurar un sistema distribuidor de líquido que comprende el aplicador de muestras. El conjunto de parámetros de funcionamiento predefinidos puede incluir al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en la altura objetivo del aplicador de muestras, una tasa a la que se distribuye la muestra de líquido desde el aplicador de muestras, una velocidad de traslación relativa entre el aplicador de muestras y el sustrato, un espacio entre filas adyacentes de líquido distribuido por el aplicador de muestras en el sustrato, una longitud de filas de líquido distribuido por el aplicador de muestras en el sustrato, una temperatura de la muestra de líquido y una humedad relativa dentro del sistema distribuidor de líquido.

Los modos de realización de los procedimientos también pueden incluir cualquiera de los otros rasgos característicos o etapas divulgados en el presente documento, en cualquier combinación, según sea apropiado.

En otro aspecto, la divulgación presenta sistemas para distribuir una muestra de líquido sobre un sustrato que incluye un aplicador de muestras, un detector configurado para obtener imágenes del aplicador de muestras y un procesador electrónico, donde el procesador electrónico está configurado para obtener una imagen del aplicador de muestras cerca del sustrato, donde la imagen incluye una primera imagen del aplicador de muestras y una segunda imagen del aplicador de muestras, determinar una altura del aplicador de muestras con respecto a un plano de superficie del sustrato en base a una distancia entre partes comunes de la primera y segunda imágenes, y distribuir la muestra de líquido sobre el sustrato usando el aplicador de muestras, donde la distribución incluye: trasladar el aplicador de muestras, trasladar el sustrato o trasladar tanto el aplicador de muestras como el sustrato para efectuar una traslación relativa entre aplicador de muestras y el sustrato; y mantener el aplicador de muestras dentro de 2 micrómetros de una altura objetivo con respecto al plano de superficie del sustrato durante el traslado.

Los modos de realización de los sistemas pueden incluir uno cualquiera o más de los siguientes rasgos característicos.

El aplicador de muestras se puede extender a lo largo de una dirección axial, y una superficie interna del aplicador de muestras se puede biselar en un ángulo con respecto a la dirección axial.

El aplicador de muestras puede incluir un canal de transporte de líquido interno que tiene un diámetro interno de entre 200 micrómetros y 650 micrómetros. El aplicador de muestras puede tener un diámetro externo, y una proporción del

diámetro externo con respecto al diámetro interno puede ser de 1,5 o menos.

El aplicador de muestras puede incluir un miembro tubular hueco flexible y un recubrimiento rígido que rodea el miembro tubular. El aplicador de muestras puede incluir un canal de transporte de líquido interno con una conformación en sección transversal no circular. La conformación en sección transversal del canal de transporte de líquido puede ser ovalada. El aplicador de muestras puede incluir una pluralidad de canales de transporte de líquido internos situados en una matriz lineal.

La primera imagen puede ser una imagen directa del aplicador de muestras y la segunda imagen puede ser una imagen del aplicador de muestras reflejada desde una superficie del sustrato, y el procesador electrónico se puede configurar para determinar la altura del aplicador de muestras con respecto a un plano de superficie del sustrato determinando una primera posición de un borde del aplicador de muestras en la primera imagen, determinando una segunda posición de un borde correspondiente del aplicador de muestras en la segunda imagen, y determinando la altura del aplicador de muestras en base a un diferencia entre la primera y segunda posiciones.

El procesador electrónico se puede configurar para distribuir una pluralidad de filas de la muestra de líquido sobre una superficie rectangular del sustrato efectuando una traslación relativa entre el aplicador de muestras y el sustrato en una dirección paralela a los bordes largos de la superficie rectangular. El procesador electrónico se puede configurar para distribuir una pluralidad de filas de la muestra de líquido sobre una superficie rectangular del sustrato efectuando una traslación relativa entre el aplicador de muestras y el sustrato en una dirección paralela a los bordes cortos de la superficie rectangular. El procesador electrónico se puede configurar para distribuir una pluralidad de filas de la muestra de líquido sobre una superficie rectangular del sustrato efectuando una traslación relativa entre el aplicador de muestras y el sustrato en un ángulo tanto para los bordes largos como cortos de la superficie rectangular.

Los sistemas pueden incluir una plataforma configurada para soportar el sustrato, donde el procesador electrónico está configurado para efectuar la traslación relativa entre el aplicador de muestras y el sustrato activando la plataforma.

La altura objetivo puede estar entre 9 micrómetros y 15 micrómetros.

Los sistemas pueden incluir un segundo detector configurado para obtener imágenes de células de la muestra de líquido en el sustrato, donde el procesador electrónico está configurado para analizar una o más imágenes de las células para determinar al menos una de una distribución de las células en el sustrato y una uniformidad de tinción de las células en el sustrato. El procesador electrónico se puede configurar para ajustar un parámetro de funcionamiento del sistema distribuidor de líquido basado en al menos una de una distribución de los glóbulos sanguíneos en el sustrato y una uniformidad de tinción de los glóbulos sanguíneos en el sustrato. El parámetro de funcionamiento puede incluir al menos una de una tasa a la que se distribuye la muestra de líquido desde el aplicador de muestras, y una velocidad de traslación relativa entre el aplicador de muestras y el sustrato. El procesador electrónico se puede configurar para distribuir la muestra de líquido sobre el sustrato en una pluralidad de filas sucesivas, y el parámetro de funcionamiento puede incluir al menos uno de un espacio entre filas adyacentes de líquido y una longitud de las filas de líquido. El parámetro de funcionamiento puede incluir al menos una temperatura de la muestra de líquido y una humedad relativa dentro del sistema distribuidor de líquido.

Los modos de realización de los sistemas también pueden incluir cualquiera de los otros rasgos característicos divulgados en el presente documento, en cualquier combinación, según sea apropiado.

Como se usa en el presente documento, el término "aplicador de muestras" se refiere a un dispositivo que distribuye una muestra sobre un sustrato. Típicamente, aunque no siempre, los aplicadores de muestras incluyen un conducto de líquido para distribuir muestras de líquido. Los aplicadores de muestras pueden incluir pipetas, agujas y tubos, por ejemplo.

Una "muestra" es una solución, una suspensión, un líquido u otro tipo de muestra de líquido distribuida por el aplicador de muestras sobre una superficie del sustrato. Una muestra puede ser una muestra biológica tal como sangre, por ejemplo.

Un "sustrato" es un miembro sobre el que se puede distribuir una muestra. Típicamente, pero no siempre, los sustratos tienen una superficie de recepción plana sobre la que se puede distribuir la muestra por el aplicador de muestras. Un sustrato de ejemplo es un portaobjetos o cualquier otro material reflectante que puede soportar una muestra.

La "superficie superior" del sustrato corresponde a la superficie de sustrato más próxima al aplicador de muestras. La "superficie inferior" del sustrato corresponde a la superficie de sustrato opuesta a la superficie superior.

Una "región de imagen directa" corresponde a una región en una imagen que incluye una imagen directa del aplicador de muestras. Una imagen directa es una imagen que no se ha reflejado desde una superficie del sustrato. Una "primera región de imagen reflejada" es una región, típicamente de la misma imagen, que incluye una imagen del aplicador de muestras que se ha reflejado desde una superficie del sustrato (la superficie superior o bien la superficie

inferior). Una "segunda región de imagen reflejada" es una región, típicamente de la misma imagen, que incluye una imagen del aplicador de muestras que también se ha reflejado desde una superficie del sustrato. En algunos modos de realización, la primera y segunda regiones de imagen reflejada corresponden a imágenes del aplicador de muestras que se han reflejado desde diferentes superficies del sustrato (por ejemplo, las superficies superior e inferior, respectivamente).

Un "borde del aplicador de muestras" se refiere a un límite, en la región de imagen directa, que delimita el aplicador de muestras de otros rasgos característicos en la región de imagen directa. Un "borde reflejado del aplicador de muestras" se refiere a un límite, en la primera región de imagen reflejada, que delimita la imagen reflejada del aplicador de muestras de otros rasgos característicos en la primera región de imagen reflejada.

Al comparar las intensidades I(1) e I(2) de los píxeles 1 y 2, respectivamente, en una región de imagen dada, el "cambio de intensidad" corresponde a I(2) - I(1). Típicamente, el aplicador de muestras en una región de imagen aparece como un rasgo característico oscuro contra un fondo más brillante (por ejemplo, el fondo es de mayor intensidad). En consecuencia, el cambio de intensidad será positivo cuando el píxel 2 es un píxel de fondo y el píxel 1 corresponde al aplicador de muestras.

La cantidad de "nivel de contraste" es una medida de la variabilidad de intensidad entre un conjunto de píxeles. El nivel de contraste se puede calcular como sigue: en primer lugar, seleccionando del conjunto de píxeles un primer subconjunto de píxeles con las mayores intensidades entre los píxeles del conjunto, y un segundo subconjunto con las menores intensidades entre los píxeles del conjunto; y en segundo lugar, calculando la diferencia entre las intensidades promedio para los dos subconjuntos. Los subconjuntos pueden ser un número fijo de píxeles o proporcional al tamaño del conjunto de píxeles (por ejemplo, 1/5 de los píxeles en el conjunto). Por ejemplo, la intensidad promedio para el subconjunto de píxeles con las mayores intensidades puede corresponder al promedio de las intensidades de píxeles más grandes *n* para una fila particular de píxeles en una imagen. La intensidad promedio para el subconjunto de píxeles con las menores intensidades puede corresponder al promedio de las intensidades de píxeles más pequeñas *m* para la fila particular. Los valores de *n* y *m* pueden ser diferentes, o los mismos. Por ejemplo, *n* puede tener un valor de 10, pero puede variar de 1 hasta el número total de píxeles para la fila. Además, *m* puede tener un valor de 10, pero puede variar de 1 hasta el número total de píxeles para la fila. Típicamente, los valores de *n* y *m* se seleccionan para el conjunto de píxeles de modo que ninguno de los píxeles seleccionados sea común tanto al primer como segundo subconjuntos.

La "altura" del aplicador de muestras se refiere a la distancia mínima entre la superficie superior del sustrato y la parte del aplicador de muestras más cercana a la superficie superior. Para un aplicador con un eje central extendido (por ejemplo, una pipeta o tubo) orientado perpendicular a la superficie del sustrato, la altura se mide a lo largo de una dirección paralela al eje central. Para un aplicador sin un eje central extendido o un eje central que no esté orientado perpendicular a la superficie del sustrato, la altura se mide en una dirección paralela a una superficie normal de la superficie del sustrato.

La "localización" del aplicador de muestras con respecto al sustrato corresponde al desplazamiento bidimensional del aplicador, en un plano paralelo a la superficie superior del sustrato, con respecto a una posición de referencia en la superficie del sustrato.

El "grosor" del sustrato corresponde a una dimensión máxima del sustrato medida entre las superficies superior e inferior en una dirección perpendicular al plano de la superficie superior.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la presente invención, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y pretenden ser limitantes.

Los detalles de uno o más modos de realización se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otros rasgos característicos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción, dibujos y reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1A es un diagrama esquemático que muestra una vista lateral de un aplicador de muestras situado perpendicular a una superficie superior de un sustrato.

La FIG. 1B es un diagrama esquemático que muestra una vista lateral de un aplicador de muestras situado en un ángulo con respecto a una superficie superior de un sustrato.

La FIG. 2 es un diagrama esquemático que muestra una vista lateral de un aplicador de muestras situado con respecto a un sustrato y un detector que captura una imagen directa y reflejada del aplicador de muestras.

La FIG. 3 es una imagen representativa esquemática que muestra una imagen directa de un aplicador de muestras dentro de una región de imagen directa y dos imágenes reflejadas del aplicador de muestras dentro de regiones de imagen reflejada.

La FIG. 4 es un diagrama de flujo que incluye una serie de etapas para determinar una posición del vértice de una imagen directa de un aplicador de muestras.

La FIG. 5A es una imagen directa representativa esquemática de un aplicador de muestras que muestra localizaciones de cambio de intensidad máximo en cada columna de píxeles.

La FIG. 5B es un gráfico que muestra el cambio de intensidad representado como una función de la posición de una columna de píxeles en la imagen de la FIG. 5A.

La FIG. 6 es un diagrama de flujo que incluye una serie de etapas para determinar una posición del vértice de una imagen reflejada de un aplicador de muestras.

La FIG. 7A es una imagen reflejada representativa esquemática de un aplicador de muestras.

La FIG. 7B es un gráfico que muestra el nivel de contraste representado como una función de la posición de la fila para cada fila de píxeles en la imagen de la FIG. 7A.

La FIG. 7C es una imagen representativa esquemática de un aplicador de muestras que muestra las posiciones del vértice del aplicador de muestras.

La FIG. 8 es un gráfico esquemático que muestra la separación entre imágenes representada como una función de una configuración de control de manipulador.

La FIG. 9 es un diagrama esquemático de un sustrato que muestra la determinación de una configuración de control asociada con el aplicador de muestras en una pluralidad de localizaciones con respecto a la superficie superior del sustrato.

La FIG. 10 es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento de muestras automatizado.

La FIG. 11 es un diagrama esquemático que muestra una vista en sección transversal de un aplicador de muestras que distribuye líquido.

La FIG. 12A es un diagrama en sección transversal de un aplicador de muestras con un perfil con reborde.

La FIG. 12B es un diagrama esquemático que muestra una vista de extremo de un aplicador de muestras con una abertura ovalada.

La FIG. 13 es un diagrama esquemático que muestra una vista en sección transversal de un aplicador de muestras con múltiples canales de líquido.

La FIG. 14 es un diagrama de flujo que muestra las etapas para ajustar los parámetros de funcionamiento de un sistema distribuidor de líquido.

Los símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Para cuantificar con exactitud los resultados directamente de una muestra preparada sobre un sustrato, la composición, configuración y altura o grosor de la muestra depositada deben ser tan altamente uniformes como sea posible en toda la superficie del sustrato de modo que cada subárea analizada de la muestra también sea representativa de la muestra preparada en el sustrato en su conjunto, y del paciente del que se extrajo la muestra. Además, las muestras altamente invariables y uniformemente preparadas proporcionan una base para comparar directamente muestras y resultados de análisis en múltiples pacientes. Al preparar muestras de manera uniforme, se pueden usar procedimientos automatizados para el análisis, mejorando significativamente el rendimiento.

Se puede usar una variedad de procedimientos diferentes para preparar muestras de manera automatizada para su posterior análisis. Para mejorar la uniformidad, una cantidad conocida de una muestra de líquido (por ejemplo, líquidos, suspensiones, soluciones y otras mezclas tales como sangre humana o animal o líquidos corporales, con o sin diluyente, por ejemplo, células de médula ósea, orina, tejido vaginal, tejido epitelial, tumores, semen, saliva y otros

líquidos corporales) se puede distribuir sobre una superficie del sustrato de manera controlada para garantizar que el líquido no se acumule o se disperse escasamente en localizaciones particulares de la superficie del sustrato (por ejemplo, para lograr, lo máximo posible, uniformidad en la muestra depositada en el sustrato). A modo de ejemplo, el siguiente análisis se refiere a la dispersión y análisis de muestras de sangre en portaobjetos. Sin embargo, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento se pueden aplicar a la preparación y análisis de una amplia variedad de muestras de líquido, como se describe anteriormente, en una amplia variedad de sustratos. Los sustratos pueden incluir, pero no se limitan a, portaobjetos de vidrio o plástico, portaobjetos de cerámica pulida o espejada, sustratos de metal pulido, plástico u otras películas flexibles para muestras y/o cualquier otro material reflectante que pueda soportar una muestra.

Sistemas y procedimientos de aplicación de muestras

Los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento se pueden usar con sistemas de preparación de muestras automatizados que distribuyen una cantidad conocida de sangre sobre la superficie de un portaobjetos usando un aplicador de muestras. Típicamente, el aplicador se mueve con respecto a la superficie del portaobjetos, distribuyendo continuamente sangre mientras se mueve con respecto al portaobjetos. La sangre se puede distribuir en una variedad de patrones de acuerdo con el movimiento del aplicador de muestras. En algunos modos de realización, por ejemplo, una plataforma que sostiene el sustrato mueve el portaobjetos en un patrón de trama debajo del aplicador de muestras, lo que da como resultado una "pintura" continua de filas de sangre en la superficie del sustrato. En determinados modos de realización, el aplicador o plataforma se pueden mover en un patrón en espiral o bustrófedon con cada fila pintada sucesivamente a continuación de la fila previa pintada en sentido opuesto en toda la superficie de la muestra. A modo de ejemplo, el siguiente análisis se refiere a distribuir sangre en un patrón en bustrófedon en la superficie del sustrato. Sin embargo, más en general, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento se pueden aplicar para distribuir líquidos en una amplia variedad de patrones, incluyendo, pero sin limitarse a, patrones de trama y patrones en espiral mientras el aplicador de muestras o bien la plataforma que soporta el sustrato o ambos se mueven durante el procedimiento de depósito de la muestra.

En algunos modos de realización, cuando se distribuye sangre en un patrón en bustrófedon, el aplicador de muestras, situado a una determinada altura por encima de la superficie del sustrato, se desliza por toda la superficie de la muestra en filas sucesivas, distribuyendo un volumen continuo de sangre a medida que se mueve. A medida que la fila de sangre se seca en la superficie del sustrato, se fusionan para formar una película continua de sangre. La uniformidad de la película depende de la manera en que se distribuyen las filas de sangre sobre el sustrato. La tasa a la que se distribuye la sangre y los espacios o superposición entre las filas sucesivas de sangre se eligen de modo que las filas adyacentes de sangre, cuando se dispersan lateralmente y se fusionan, forman una película con una distribución celular por todo el sustrato que es lo más uniforme posible, por ejemplo, una célula de grosor. Idealmente, las células dentro de la película se depositan a un grosor deseado en el sustrato tan densamente como sea posible mientras se mantiene un espacio invariable entre células para minimizar la superposición o el contacto entre células adyacentes (por ejemplo, una capa de células uniformemente distribuidas por toda la superficie del sustrato donde cada célula se separa de células adyacentes por la mitad del grosor de la célula).

Un factor importante que influye en la uniformidad de la película global es la uniformidad del ancho de las filas individuales de sangre depositadas sobre un sustrato. Típicamente, cuanto mayor es la uniformidad del ancho de cada fila, mayor es la uniformidad de la película global que se forma en el sustrato. El ancho de una fila dada de sangre distribuida está relacionada con la altura del aplicador por encima de la superficie superior del sustrato a medida que el aplicador se traslada a nuevas localizaciones con respecto a la superficie debido a las fuerzas capilares dentro de la muestra en el sustrato contiguo a la muestra que se distribuye desde el aplicador. Para lograr una película uniforme con una monocapa de células en la superficie del sustrato, las fuerzas capilares dentro de la muestra se equilibran con las fuerzas dispersivas que tienden a provocar la dispersión de las filas distribuidas en la superficie del sustrato. Equilibrando estas fuerzas, las filas adyacentes se fusionan para formar una película uniforme en la superficie de la muestra en la que las células y otros componentes de la muestra se dispersan ni demasiado finamente ni demasiado irregularmente.

Además de controlar el ancho de una fila de sangre distribuida controlando la altura del aplicador por encima del sustrato, la viscosidad de la muestra de líquido y la tasa a la que se mueven el aplicador y el sustrato entre sí influyen en el ancho de una fila dada de sangre distribuida sobre el sustrato. En general, cuanto mayor es la altura del aplicador por encima de la superficie (por ejemplo, cuanto mayor es el espacio entre el aplicador y la superficie), mayor es el ancho de las filas distribuidas. Es decir, la tasa a la que se distribuye sangre sobre la superficie del portaobjetos está relacionada con el volumen de la región entre el aplicador y la superficie del sustrato. Por lo tanto, las variaciones en el volumen de esta región están relacionadas con variaciones en la altura del aplicador por encima de la superficie del sustrato. Por tanto, para distribuir filas que sean tan uniformes en ancho, altura y distribución celular como sea posible, es importante: (a) mantener tan uniforme una altura del aplicador por encima de la superficie del sustrato como sea posible a medida que el aplicador se traslada o se mueve de una localización a otra localización con respecto a la superficie del sustrato; y (b) distribuir la muestra a un caudal que ni cede a las fuerzas capilares presentes en la muestra depositada en el sustrato y contigua a la muestra en el aplicador, ni domina estas fuerzas capilares. Además, depositar filas ligeramente superpuestas (por ejemplo, superpuestas en 1/8, 1/4, 1/2 o 1/3 del diámetro del aplicador de muestras) puede mejorar la uniformidad global de una muestra depositada sobre un sustrato.

Debido a que la viscosidad y la tensión de superficie de la sangre son ambas relativamente altas, la cantidad de dispersión lateral de las filas distribuidas es más pequeña que la que se produciría para las filas de un líquido con una tensión de superficie más pequeña, tal como agua o una muestra de sangre mezclada con un diluyente. Por tanto, la viscosidad y la tensión de superficie se pueden determinar y monitorizar para garantizar que el espacio entre las filas de sangre sea adecuado para lograr la cobertura global deseada.

Se ha determinado a través de una experimentación cuidadosa que para un aplicador de muestras que tiene un diámetro externo de aproximadamente 1500 a 500 micrómetros y un diámetro interno de aproximadamente 500 a 100 micrómetros (por ejemplo, un aplicador de muestras con un diámetro externo de aproximadamente 812 micrómetros y un diámetro interno de aproximadamente 431 micrómetros), usado para distribuir filas de sangre que cubren un área de 600 milímetros cuadrados en la superficie de un sustrato de vidrio, una altura adecuada para el aplicador por encima de la superficie del sustrato (por ejemplo, un portaobjetos) es de aproximadamente 8 a 20 micrómetros (por ejemplo, 10, 12, 14, 16 o 18 micrómetros). En promedio, por ejemplo, la altura del aplicador de muestras por encima de la superficie del sustrato de vidrio se puede mantener a aproximadamente 12 micrómetros. A esta altura, para garantizar que las filas de sangre se distribuyen con suficiente uniformidad, la altura del aplicador por encima de la superficie del sustrato no debe variar en más de 2 micrómetros.

Además, se ha observado que los portaobjetos ordinarios pueden variar en grosor de un portaobjetos a otro en tanto como 25 micrómetros entre las superficies superior e inferior del portaobjetos. La variación en el grosor del portaobjetos puede alterar significativamente la consistencia o uniformidad de las muestras depositadas en un portaobjetos si el aplicador se fija en su posición en un marco de referencia de laboratorio, independientemente del grosor del sustrato. Si el grosor del sustrato varía, entonces mantener el aplicador en una posición fija a lo largo de un eje normal con respecto a la superficie del sustrato puede dar como resultado variaciones en la altura del aplicador por encima de la superficie del sustrato a medida que el aplicador y el sustrato se muevan entre sí debido al grosor variable del sustrato. Además, aunque los sustratos, como los portaobjetos, se mantienen en una orientación de modo que la superficie del portaobjetos sea plana y nominalmente ortogonal al eje central del aplicador, en la práctica, un sustrato se puede orientar de modo que su superficie superior esté algo inclinada respecto al eje central del aplicador, lo que complica además la tarea de mantener una altura constante del aplicador.

Dadas las limitaciones anteriores, los procedimientos y sistemas que pueden determinar la altura del aplicador de muestras por encima de la superficie superior del sustrato son importantes para garantizar que se puedan usar procedimientos automatizados para preparar muestras de sangre que correspondan a un volumen invariable de analito (por ejemplo, 1 microlitro de sangre) dispersado en una muestra distribuida uniformemente por toda la superficie de un sustrato. Además, debido a la tolerancia relativamente pequeña para variaciones en la altura del aplicador, es importante que se determine la altura del aplicador sin permitir que el aplicador entre en contacto físicamente con el sustrato durante el depósito de la muestra o fuera de un procedimiento de calibración. El contacto físico no controlado o involuntario entre el aplicador y el sustrato podría potencialmente dañar la punta del aplicador o desplazar el sustrato de su posición original, lo que impediría una determinación exacta de la posición del aplicador. Además, si la punta del aplicador incluye una gota de muestra y la gota entra en contacto con el sustrato antes de que el aplicador deposite la muestra sobre el sustrato, se pueden depositar células adicionales sobre la superficie del sustrato, afectando de este modo erróneamente los resultados cuantitativos para una muestra del volumen esperado.

Los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento se pueden usar para determinar tanto la altura del aplicador de muestras por encima de la superficie del sustrato como el grosor del sustrato. Típicamente, las mediciones de la altura se realizan en una o más localizaciones de la superficie del sustrato. En cada localización, el aplicador de muestras se escanea a través de una serie de desplazamientos con respecto a la superficie del sustrato. En cada valor de desplazamiento, se determina la altura del aplicador por encima de la superficie del sustrato, y se correlaciona con una configuración particular del manipulador del aplicador que controla el desplazamiento del aplicador. En cada localización, se determina una configuración de manipulador que corresponde a la altura objetivo (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 micrómetros) del aplicador por encima de la superficie del sustrato. De esta manera, se determinan posiciones adecuadas para el aplicador en múltiples localizaciones en la superficie del sustrato. En cada localización, el grosor del sustrato también se puede determinar para refinar además los datos de altura posicional para el aplicador.

Después de que se haya determinado esta información para el sustrato, el aplicador puede distribuir filas de sangre sin hacer ninguna otra medición de la altura del aplicador. En efecto, el conjunto inicial de mediciones de la altura usadas para determinar configuraciones adecuadas para el manipulador del aplicador funciona como datos de calibración para el funcionamiento de distribución. Calibrando antes del funcionamiento de distribución, se puede distribuir una cantidad conocida de sangre de forma continua (por ejemplo, en filas) sin realizar mediciones de la altura del aplicador, al tiempo que se permite un ajuste continuo y controlado de la altura del aplicador para garantizar que la sangre se distribuya regular y uniformemente, y cada fila se deja secar durante la misma cantidad de tiempo antes de que se distribuya una fila adyacente. Este patrón de distribución regular y uniforme en filas ayuda a garantizar que la muestra de sangre resultante sea lo más uniforme posible cuando se haya secado.

Sistemas y procedimientos de determinación de la altura del aplicador de muestras

La FIG. 1A muestra un diagrama esquemático de un sistema 50 que presenta un aplicador de muestras 100 situado por encima de una superficie superior de un sustrato 102. El aplicador de muestras 100 distribuye una muestra de líquido 104 sobre el sustrato 102. El sustrato 102 tiene un grosor t, y el aplicador de muestras 100 se sitúa a una altura h por encima de la superficie superior del sustrato 102. Tanto t como h se miden a lo largo de una dirección paralela al eje central 108 del aplicador de muestras 100. Se sitúa un detector 106 para detectar los rayos de luz 110 del aplicador de muestras 100 y/o el sustrato 102 que se propagan en ángulo con respecto al eje central 108 del aplicador de muestras 100. El aplicador de muestras 100 está conectado mecánicamente a un manipulador 150, y el sustrato 102 se soporta por una plataforma 152. El manipulador 150 y la plataforma 152 están conectados eléctricamente (por ejemplo, por cables o de forma inalámbrica) a la unidad de control 160, que incluye un procesador electrónico 162.

En la FIG. 1A, el eje central 108 del aplicador de muestras 100 es nominalmente ortogonal al plano del sustrato 102. En determinados modos de realización, el eje central del aplicador de muestras 100 puede no ser ortogonal al plano del sustrato 102. La FIG. 1B muestra un diagrama esquemático de un aplicador de muestras 100 que distribuye líquido 104 sobre la superficie del sustrato 102. En la FIG. 1B, el sustrato 102 está orientado en un ángulo θ con respecto a un plano perpendicular al eje central 108 del aplicador de muestras 100. El ángulo θ corresponde al ángulo de inclinación del sustrato 102 en un sistema de coordenadas externo, tal como el sistema de coordenadas del manipulador 150. En la FIG. 1B, el eje 112 corresponde a una dirección a lo largo de la que el aplicador de muestras 102 se traslada por el manipulador 150. El manipulador 150 también puede trasladar el aplicador de muestras 102 a lo largo de un segundo eje ortogonal al plano de la FIG. 1B y al eje 112; se puede eliminar la inclinación del sustrato 102 con respecto al segundo eje (por ejemplo, como en la FIG. 1A), o el sustrato 102 se puede inclinar con respecto al segundo eje. En general, el ángulo de inclinación con respecto al segundo eje puede ser igual o diferente del ángulo de inclinación con respecto al eje 112.

La FIG. 2 muestra una vista ampliada del modo de realización de la FIG. 1A. En la FIG. 2 (como en la FIG. 1A), un aplicador de muestras 100 se sitúa a una altura h por encima de una superficie superior del sustrato 102. El líquido 104, distribuido por el aplicador 100, no se muestra en la FIG. 2 para mayor claridad. Los rayos de luz que emergen de múltiples puntos en el aplicador de muestras 100 se capturan por el detector 106. A modo de ilustración, se muestra una serie de rayos de luz que emergen del punto 100a en la superficie del aplicador de muestras 100. Los rayos 110a, 110b y 110c emergen del punto 100a y se detectan directamente por el detector 106; estos rayos forman una imagen directa (por ejemplo, no reflejada) del punto 100a. En una imagen formada en el detector 106, los rayos 110a-c forman una parte de una región de imagen directa que corresponde a la imagen directa del aplicador 100.

Los rayos 110d, 110e y 110f también emergen del punto 100a. Sin embargo, los rayos 100d-f inicialmente se propagan de forma descendente hacia la superficie superior 102a del sustrato 102. Al encontrarse con la superficie superior 102a, una parte de cada uno de los rayos 110d-f se refleja desde la superficie superior hacia el detector 106. Las partes reflejadas corresponden a los rayos 110g, 110h y 110i. Estos rayos forman una imagen indirecta (por ejemplo, reflejada) del punto 100a en una primera región de imagen reflejada de la imagen formada en el detector 106.

Partes de rayos 110d-f en la FIG. 2 sufren refracción en lugar de reflexión en la superficie superior 102a. Estos rayos refractados se propagan a través del sustrato 102, y se reflejan desde la superficie inferior 102b del sustrato 102. Al encontrarse con la superficie superior 102a una segunda vez, los rayos vuelven a sufrir refracción en la superficie superior, emergen del sustrato 102 y se propagan hacia el detector 106 como los rayos 110j, 110k y 110l. Los rayos 110j-l forman una segunda imagen indirecta (por ejemplo, reflejada) del punto 100a en una segunda región de imagen reflejada de la imagen formada en el detector 106.

La FIG. 3 muestra una imagen esquemática ejemplar 300 formada en el detector 106. La imagen 300 incluye una imagen directa 302 del aplicador de muestras 100, una primera imagen reflejada 304 del aplicador de muestras 100, y una segunda imagen reflejada 306 del aplicador de muestras 100. La primera imagen reflejada 304 está formada por rayos reflejados desde la superficie superior 102a del sustrato 102 (por ejemplo, rayos 110g-i). La segunda imagen reflejada 306 está formada por rayos reflejados desde la superficie inferior 102b del sustrato 102 (por ejemplo, rayos 110j-l).

Como es evidente a partir de las FIGS. 2 y 3, la imagen directa correspondiente a los rayos 110a-c se desplaza lateralmente desde la imagen reflejada correspondiente al haz de rayos 110g-i en el plano de la imagen formada en el detector 106 en una cantidad μh que está relacionada con la altura h del aplicador de muestras 100 por encima de la superficie 102a del sustrato 102. A medida que el aplicador de muestras 100 se acerca a la superficie superior 102a, se reduce el desplazamiento μh entre las imágenes directa y reflejada del aplicador de muestras 100. Por el contrario, a medida que se incrementa h, el desplazamiento entre las imágenes μh también se incrementa.

De manera similar, la imagen reflejada correspondiente a los rayos 110g-i se desplaza lateralmente desde la imagen reflejada correspondiente a los rayos 110j-l en el plano de imagen en el detector 106 en una cantidad μt que está relacionada con el grosor t del sustrato 102. Para sustratos más gruesos (por ejemplo, donde la distancia entre las superficies 102a y 102b es mayor), el desplazamiento μt también es mayor. Para sustratos más delgados, se reduce μt.

En consecuencia, determinando los desplazamientos entre las imágenes directa y reflejada del aplicador de muestras 100 en una o más imágenes capturadas por el detector 106, se pueden estimar la altura h del aplicador de muestras por encima del sustrato 102 y el grosor t del sustrato 102. Además, calibrando las mediciones de píxeles de la imagen con desplazamientos lineales conocidos, las mediciones de altura y grosor basadas en píxeles se pueden convertir en unidades de longitud (por ejemplo, micrómetros).

Para determinar la posición del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102 (por ejemplo, la altura del aplicador de muestras 100 sobre el sustrato 102), se determina el desplazamiento μh entre las imágenes 302 y 304 en la FIG. 3. La primera etapa para medir esta distancia es determinar una posición del vértice para la imagen directa 302 del aplicador de muestras 100. La FIG. 4 es un diagrama de flujo 400 que incluye una serie de etapas para determinar una posición del vértice de una imagen directa de un aplicador de muestras. En una primera etapa 402 en el diagrama de flujo 400, se analiza una imagen directa del aplicador de muestras 100 para seleccionar subconjuntos de píxeles que se usarán para calcular un gradiente de intensidad a lo largo del eje central 108 del aplicador. La FIG. 5A muestra una media imagen 500 de un aplicador de muestras 100. El eje central 108 del aplicador que se muestra en la media imagen coincide con el borde más a la derecha de la imagen 500. En la FIG. 5A, las columnas de píxeles 502, 504, 506, 508, 510 y 512 se extienden paralelas al eje central 108. En consecuencia, cada una de estas columnas de píxeles se selecciona en la etapa 402 para un análisis adicional.

A continuación, en la etapa 404, cada subconjunto (por ejemplo, columna) de píxeles identificados en la etapa 402 se analiza por separado calculando un gradiente de intensidad a lo largo de la columna. En determinados modos de realización, el gradiente se calcula a lo largo de la columna de píxeles usando un núcleo de detección de bordes (por ejemplo, un núcleo de cuatro píxeles de [1, 3, -3, -1]). En algunos modos de realización, el gradiente se puede calcular determinando las diferencias de intensidad entre cada píxel adyacente en la columna. El cambio de la intensidad ΔI entre dos píxeles adyacentes 1 y 2 se calcula como $\Delta I = I(2) - I(1)$, donde $I(1)$ e $I(2)$ son las intensidades medidas de los píxeles 1 y 2, respectivamente. Este procedimiento se ilustra en la FIG. 5B para la columna de píxeles 506, donde el cambio de intensidad se representa a lo largo del eje superior (horizontal) con respecto a la posición de la columna en el eje izquierdo (vertical). Por ejemplo, el punto representado más arriba 514 a lo largo del eje vertical corresponde al cambio de intensidad entre el primer píxel 516 y el segundo píxel 518 en la columna 506. La coordenada vertical del punto 514 corresponde a la línea divisoria entre los píxeles; la coordenada horizontal del punto 514 corresponde al cambio de intensidad calculado entre los píxeles. Como la intensidad del segundo píxel 518 en la columna 506 es mayor que la intensidad del primer píxel 516 (por ejemplo, el segundo píxel aparece más brillante que el primero), el cambio de intensidad es positivo. Como es evidente a partir de la FIG. 5B, el mayor cambio de intensidad en la columna 506 se produce entre el cuarto píxel 520 y el quinto píxel 522; este cambio de intensidad está representado por el punto 524 en la FIG. 5B.

Volviendo a la FIG. 4, en la etapa 406, la posición del cambio máximo de intensidad se determina para cada columna de píxeles. Para cada columna de píxeles, el procedimiento de determinar la posición del cambio máximo de intensidad en general se logra ajustando una forma funcional a los valores del cambio de intensidad calculados entre píxeles adyacentes de la columna en la etapa 404. Este procedimiento se ilustra en la FIG. 5B, donde la curva 526 se ha ajustado a algunos de los valores calculados del cambio de intensidad. En general, se puede usar una variedad de formas funcionales diferentes para determinar la posición del cambio máximo de intensidad. En la FIG. 5B, se ajustó una forma funcional parabólica al cambio máximo de intensidad entre píxeles adyacente (por ejemplo, punto 524) y a los valores calculados del cambio de intensidad en cada lado del máximo. Como se muestra en la FIG. 5B, la posición de cambio máximo de intensidad para la columna de píxeles 506 se interpola a continuación como el pico de la curva parabólica ajustada, punto 528. En el ejemplo de la FIG. 5B, la posición del cambio máximo de intensidad, punto 528, no se correspondía exactamente con las posiciones de ninguna de las divisiones entre píxeles adyacentes. En cambio, la posición del cambio de intensidad máximo estaba dentro del píxel 520.

Este procedimiento se repite para cada una de las columnas de píxeles en la FIG. 5A para determinar una posición del cambio de intensidad máximo para cada columna. Las posiciones máximas determinadas se muestran como líneas 530, 532, 534, 536, 538 y 540 en la FIG. 5A. Como se puede ver al comparar las FIGS. 5A y 5B, la posición máxima 534 en la columna 506 corresponde a la posición del punto 528 en la FIG. 5B.

Volviendo a la FIG. 4, después de que se hayan determinado las posiciones de cambio de intensidad máximo para cada columna de píxeles en la etapa 406, la posición del vértice del aplicador de muestras se determina en la etapa 408. En general, la posición del vértice del aplicador de muestras corresponde aproximadamente al cambio máximo de intensidad que está más alejado del borde oscuro entre las columnas de píxeles de la imagen 500 en la FIG. 5A (es decir, la fila horizontal superior de píxeles mostrada en la FIG. 5A). En referencia a la FIG. 5A, este borde oscuro de la imagen del aplicador de muestras corresponde al cuerpo del aplicador de muestras, mientras que el borde brillante corresponde al extremo del aplicador más cercano al sustrato 102. En consecuencia, la posición del vértice del aplicador de muestras 100 - el punto en la imagen directa del aplicador de muestras que está más cerca de las imágenes reflejadas del aplicador de muestras - se identifica aproximadamente como la posición del cambio máximo de intensidad, seleccionado de entre todas las columnas de píxeles, que está más cerca del borde brillante de la imagen directa. En la FIG. 5A, la posición del cambio máximo de intensidad para la columna de píxeles 512, posición 540, está más cerca del borde brillante de la imagen 500 (es decir, la fila horizontal inferior de píxeles mostrada en la FIG. 5A). En consecuencia, la posición del vértice del aplicador de muestras en la imagen directa del aplicador se

identifica aproximadamente como el punto 540 en la FIG. 5A.

En algunos modos de realización, la posición del vértice del aplicador de muestras se puede refinar además ajustando una forma funcional a las posiciones del cambio máximo de intensidad para cada columna de píxeles. Por ejemplo, una forma funcional (por ejemplo, una forma funcional parabólica) se puede ajustar a las posiciones 530, 532, 534, 536, 538 y 540, y el vértice del aplicador de muestras se puede determinar como vértice de la forma parabólica ajustada. En la FIG. 5A, una parábola ajustada a las posiciones 530, 532, 534, 536, 538 y 540 tendrá un vértice que coincide aproximadamente con la posición 540. Sin embargo, más en general, la conformación funcional ajustada puede no coincidir exactamente con ninguna de las posiciones del cambio máximo de intensidad para las columnas de píxeles, debido a artefactos de imagen e irregularidades en la conformación del aplicador de muestras 100, por ejemplo.

Se ha determinado experimentalmente que una forma funcional parabólica típicamente proporciona una posición del vértice exacta para el aplicador de muestras. Como se analiza anteriormente, la posición del vértice del aplicador 100 se puede determinar a partir de la imagen directa como el punto máximo de la función ajustada (por ejemplo, el vértice de la parábola) más cercano al sustrato. También se pueden usar otras formas funcionales para determinar la posición del vértice para el aplicador de muestras. Por ejemplo, en algunos modos de realización, se puede ajustar una forma funcional elíptica a las localizaciones del borde del aplicador para determinar la posición del vértice del aplicador de muestras. Típicamente, una forma funcional elíptica coincide estrechamente con los bordes del aplicador porque el perfil del borde del aplicador es elíptico en las imágenes reflejadas.

Habiendo determinado la posición del vértice del aplicador de muestras en la imagen directa usando al menos uno de los procedimientos anteriores, el procedimiento mostrado en la FIG. 4 termina en la etapa 410.

La siguiente etapa para determinar una posición del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102 es determinar una posición del vértice para la imagen del aplicador de muestras 100 que corresponde a la reflexión desde la superficie superior 102a del sustrato 102. La FIG. 6 muestra un diagrama de flujo 600 que incluye una serie de etapas para determinar una posición del vértice de una imagen reflejada del aplicador de muestras. La primera etapa 602 en el diagrama de flujo 600 es identificar la imagen del aplicador de muestras que corresponde a la reflexión desde la superficie superior 102a del sustrato 102.

En algunos modos de realización, el procedimiento divulgado previamente con respecto a la FIG. 4 para localizar el vértice de la imagen directa del aplicador de muestras se puede usar para determinar la posición del vértice de una imagen reflejada del aplicador de muestras. De forma alternativa, y en particular cuando la imagen reflejada del aplicador de muestras no está tan bien focalizada como la imagen directa, se pueden usar otros procedimientos para determinar la posición del vértice. La FIG. 7A muestra una representación esquemática de una imagen típica 700 capturada por el detector 106. Una región de imagen directa 702 de la imagen 700 incluye una imagen directa 704 del aplicador de muestras 100. Una primera región de imagen reflejada 706 incluye una primera imagen reflejada 708 del aplicador de muestras 100. Una segunda región de imagen reflejada 707 incluye una segunda imagen reflejada 710 (superpuesta sobre una parte de la primera imagen reflejada) del aplicador de muestras 100. La primera imagen reflejada 708 corresponde a la reflexión desde la superficie superior 102a del sustrato 102, como se explica anteriormente.

Volviendo a la FIG. 6, la segunda etapa 604 en el diagrama de flujo 600 es identificar filas de píxeles que se extienden en una dirección perpendicular al eje central 108 del aplicador de muestras 100 en la región de imagen reflejada. En la FIG. 7A, el eje central 108 en la primera y segunda regiones de imagen reflejada se extiende en una dirección paralela a los bordes izquierdo y derecho de la imagen 700; en consecuencia, las filas adecuadas de píxeles se extienden en una dirección paralela a los bordes superior e inferior de la imagen 700.

La identificación de filas adecuadas de píxeles que se van a usar para encontrar la posición del vértice de la imagen reflejada del aplicador de muestras también puede implicar la exclusión de determinadas filas. Por ejemplo, la posición del vértice de la imagen directa del aplicador de muestras, punto 712, ya se ha determinado usando el procedimiento descrito en el diagrama de flujo 400. En consecuencia, con referencia a la imagen 700, las filas de píxeles por encima del punto 712 no necesitan considerarse más, ya que la imagen reflejada del aplicador de muestras no aparecerá en estas filas.

En determinados modos de realización, las filas de píxeles también se pueden acortar para acelerar las operaciones computacionales. Por ejemplo, en referencia a la FIG. 7A, las posiciones del borde de la imagen directa del aplicador de muestras se pueden determinar a partir del análisis de la imagen 704. Se puede suponer que las posiciones del borde de las imágenes reflejadas 708 y 710 del aplicador de muestras se encuentran aproximadamente en las mismas localizaciones que las posiciones del borde de la imagen directa 704. En consecuencia, las filas de píxeles que se usan para encontrar la posición del vértice de la imagen reflejada del aplicador de muestras se pueden acortar aplicando los límites de borde 714 y 716 en la FIG. 7A. Además, se pueden seleccionar límites de borde para excluir otros rasgos característicos del sustrato (por ejemplo, logotipos pintados, marcos de muestras, marcas fiduciarias) de la primera región de imagen reflejada. Los límites de borde 714 y 716 pueden estar en ángulo con respecto al eje central 108 como se muestra en la FIG. 7A, o pueden ser paralelos al eje central 108. El ángulo de los límites de borde con

respecto al eje central 108 puede ser de 5° o más (por ejemplo, 10° o más, 15° o más, 20° o más, 25° o más, 30° o más, 40° o más, 50° o más).

Volviendo de nuevo a la FIG. 6, después de que se hayan identificado las filas adecuadas de píxeles en la etapa 604 (que puede incluir acortar las filas identificadas), el nivel de contraste para cada fila de píxeles se determina en la etapa 606. El nivel de contraste se puede determinar en una variedad de maneras; el siguiente análisis presenta una serie particular de etapas para realizar este cálculo, pero se debe entender que también se pueden usar otros procedimientos para medir la variabilidad de la intensidad para cada fila de píxeles.

En determinados modos de realización, la primera etapa para determinar el nivel de contraste para una fila particular de píxeles incluye determinar una intensidad promedio para un subconjunto de los píxeles más brillantes (por ejemplo, la intensidad más alta) dentro de una fila dada. La determinación de una intensidad promedio para un subconjunto de píxeles con los valores de intensidad más altos para una fila de píxeles implica determinar el promedio de las mayores intensidades de píxeles *n* en la fila. El valor de *n* puede ser de 1 o más (por ejemplo, de 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 8 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, 30 o más), o *n* se puede expresar como una fracción del número total de píxeles en la fila (por ejemplo, 1/4 o menos, 1/5 o menos, 1/6 o menos, 1/7 o menos). Típicamente, el valor de *n* se elige de modo que el subconjunto de píxeles de mayor intensidad no incluya píxeles que correspondan a la imagen reflejada 708 del aplicador de muestras.

La siguiente etapa para determinar el nivel de contraste para la fila de píxeles es determinar la intensidad promedio para un subconjunto de los píxeles más oscuros (por ejemplo, la menor intensidad) dentro de las filas. La intensidad promedio para los píxeles más oscuros con una fila se puede calcular como el promedio de las intensidades más pequeñas *m* para píxeles en la fila. El valor de *m* puede ser de 1 o más (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 8 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, 30 o más), o *m* se puede expresar como una fracción del número total de píxeles en la fila (por ejemplo, 1/4 o menos, 1/5 o menos, 1/6 o menos, 1/7 o menos). Típicamente, el valor de *m* se elige de modo que el subconjunto de píxeles de menor intensidad no incluya píxeles que correspondan a la parte de fondo de la imagen (es decir, que no contiene la imagen reflejada 708 del aplicador de muestras).

Finalmente, el nivel de contraste para la fila de píxeles se calcula como la diferencia entre la intensidad promedio para el subconjunto de píxeles de mayor intensidad para la fila y la intensidad promedio para el subconjunto de píxeles de menor intensidad para las filas. El procedimiento anterior se puede repetir para cada fila de píxeles identificada en la etapa 604, de modo que cada fila de píxeles tenga un nivel de contraste asociado.

A continuación, en la etapa 608, la posición del vértice de la imagen reflejada del aplicador de muestras 100 se puede determinar en base al cambio en los valores de nivel de contraste entre cada una de las filas de píxeles. La FIG. 7B muestra el nivel de contraste (en el eje horizontal superior) representado como una función de la fila de píxeles (en el eje vertical izquierdo) para la imagen 700 en la FIG. 7A. La determinación de la posición del vértice de la imagen reflejada del aplicador de muestras se basa en la observación de que, en las filas de píxeles que no corresponden a una imagen del aplicador de muestras, el nivel de contraste será relativamente pequeño, y en las filas de píxeles que sí corresponden a una imagen del aplicador de muestras, el nivel de contraste será considerablemente mayor. Por ejemplo, en la FIG. 7A, la fila de píxeles 718 no corresponde a la primera imagen reflejada 708 del aplicador de muestras; como resultado, el nivel de contraste en la fila 718 es pequeño, como se indica por el punto 722 en la FIG. 7B. Por el contrario, la fila de píxeles 720 corresponde a la primera imagen reflejada 708; en consecuencia, el nivel de contraste en la fila 720 es mayor que en la fila 718, como se indica por el punto 724 en la FIG. 7B.

Representando el nivel de contraste como una función de la fila de píxeles en la FIG. 7B, las filas de píxeles que corresponden a imágenes no reflejadas, a la primera imagen reflejada 708, y a la combinación de la primera y segunda imágenes reflejadas, 708 y 710, se pueden identificar en base a los cambios en el nivel de contraste entre las filas de píxeles. Como se muestra en las FIGS. 7A y 7B, la punta del aplicador en la primera región de imagen reflejada de la FIG. 7A corresponde al mayor cambio en el nivel de contraste entre las filas de píxeles en la primera región de imagen reflejada 706, indicada como el punto 726 en la FIG. 7B. Con la posición del vértice de la primera imagen reflejada 708 del aplicador de muestras determinada en la etapa 608, el procedimiento en el diagrama de flujo 600 termina a continuación en la etapa 610. Se puede repetir un procedimiento similar, como se describe a continuación, para determinar la posición del vértice de la segunda imagen reflejada 710 del aplicador de muestras, que se muestra como el punto 728 en la FIG. 7B.

Determinación de la altura del aplicador

Habiendo determinado las posiciones del vértice de la imagen directa 704 y de la primera imagen reflejada 708 desde la superficie superior del sustrato como se describe anteriormente, la altura del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102 se puede determinar calculando la separación h entre las posiciones del vértice. La FIG. 7C muestra una imagen representativa esquemática en la que se han determinado la posición del vértice de la imagen directa, punto 712, y la posición del vértice de la primera imagen reflejada, punto 726. La separación μh entre las imágenes se puede calcular de manera directa (en unidades de píxeles de imagen) a partir de la diferencia entre las posiciones del vértice. Si se desea, la separación μh se puede convertir a unidades de longitud (por ejemplo, micrómetros) en base a la información de calibración determinada previamente.

Calibración - Consideraciones generales

La información de calibración se puede determinar correlacionando una separación conocida (en unidades de longitud, como micrómetros) entre el aplicador de muestras y la superficie superior de un sustrato basada en una posición conocida de la plataforma o aplicador con respecto a una separación de píxeles entre el aplicador y la superficie superior del sustrato en una región de imagen reflejada. Después de esto, la información de calibración se puede usar para interpolar separaciones de píxeles y posiciones de la plataforma o aplicador para encontrar la posición deseada de la plataforma o aplicador que proporciona la separación de píxeles deseada, y la posición de la plataforma o aplicador se puede desplazar en base a la separación calibrada para lograr la separación deseada entre el aplicador y la superficie superior del portaobjetos. De forma alternativa, la unidad de control 160 puede (a) correlacionar las posiciones del manipulador 150 o plataforma 152 con los casos en que el detector 106 adquiere una imagen del aplicador de muestras en contacto con un sustrato, y (b) extrapolar las posiciones del manipulador o plataforma correlacionadas con una separación deseada entre el aplicador de muestras y el sustrato.

Calibración de la detección táctil de la superficie

Se pueden usar una variedad de procedimientos para calibrar los sistemas divulgados en el presente documento de modo que las mediciones de la separación µh entre imágenes directas y reflejadas del aplicador de muestras se puedan convertir en mediciones de la altura h del aplicador de muestras por encima de la superficie del sustrato 102. Uno de dichos procedimientos se analiza a continuación, pero se debe entender que también se pueden usar otros procedimientos para la calibración.

En algunos modos de realización, los actuadores usados para controlar la posición del aplicador de muestras (por ejemplo, actuadores presentes en el manipulador 150 y/o plataforma 152 y controlados por la unidad de control 160) pueden incluir actuadores lineales no accionados por tornillo, tales como cojinetes de rodillos cruzados lineales o actuadores lineales con cojinetes de aire, como los disponibles en Dover (Westborough, MA), en los que el motor, el cojinete y el codificador no están en contacto directo. Además de permitir el movimiento a lo largo de un eje cuando se entrega una señal de control adecuada, dichos actuadores también pueden permitir la generación y medición de fuerza a lo largo de la dirección del movimiento. Cuando dichos actuadores se usan en los sistemas divulgados en el presente documento, la obtención de información de calibración típicamente se produce de acuerdo con un procedimiento de dos etapas separado en una primera etapa de "calibración con convertidores de digital a analógico ("DAC")" y una segunda etapa de "desplazamiento del aplicador".

En la etapa de calibración con DAC, con el aplicador de muestras sin contacto con la superficie del portaobjetos, se termina el servobucle que típicamente acciona el actuador y el amplificador del actuador se reactiva de inmediato con una señal de control de desplazamiento de DAC fija. Esta señal de desplazamiento de DAC se entrega al actuador por el manipulador 150 desde la unidad de control 160 para iniciar el movimiento del actuador en un sentido "ascendente" (por ejemplo, paralelo al eje central 108 del aplicador y lejos de la superficie del sustrato 102). Como resultado, el actuador y el aplicador de muestras se accionan juntos de forma ascendente por la señal de control de desplazamiento de DAC fija. Después de permitir que la señal de control de desplazamiento de DAC fija mueva el actuador y el aplicador de muestras durante un período de tiempo establecido, se mide la posición del actuador. La rutina de calibración comienza nuevamente con una señal de control de desplazamiento de DAC más pequeña, y continúa repitiéndose hasta que el movimiento del actuador, durante el período de tiempo establecido, pasa una condición de umbral predeterminada en la dirección descendente. Se almacena el valor de señal de control de desplazamiento de DAC que satisface este umbral. El valor de la señal de control de desplazamiento de DAC almacenada, cuando se aplica sin un servobucle activo, produce suficiente fuerza ascendente de modo que el actuador apenas se superará por la fuerza de la gravedad.

Una vez que la señal de control de desplazamiento de DAC se haya calibrado, el actuador mueve el aplicador de muestras a una posición que se sabe que está por encima de la superficie del sustrato. Se establece un umbral de error de seguimiento grave (por ejemplo, entrada por un operario del sistema, recuperación desde un medio de almacenamiento o codificado en un programa informático o equipo físico) de modo que cuando el error de seguimiento del servobucle sobrepase al error de seguimiento grave, se termine el servobucle. El actuador y el aplicador de muestras se desplazan lentamente hacia la superficie del sustrato, bajo el control del servobucle, mientras que el error de seguimiento del servobucle se mide por la unidad de control 160. Cuando el aplicador de muestras entra en contacto físico con la superficie del sustrato y continúa accionándose de forma descendente, el error de seguimiento del servobucle se acumula y sobrepasará rápidamente al error de seguimiento grave; entonces se termina el servobucle. La unidad de control 160 reactiva a continuación el amplificador del actuador y activa la señal de control de desplazamiento de DAC calibrada.

El resultado de esta segunda plataforma de calibración es que el aplicador de muestras descansa casi sin peso en la superficie del sustrato. Después de esperar durante un período de tiempo para que el actuador se estabilice en su posición, la unidad de control 160 lee la posición del actuador y opcionalmente convierte la posición en unidades de posición (por ejemplo, micrómetros). Este valor se almacena como la posición de la superficie del sustrato (por ejemplo, la posición h = 0). El aplicador de muestras se puede trasladar a continuación a una posición por encima de la

superficie del sustrato, y la posición (por ejemplo, medida leyendo desde el codificador del actuador) se puede correlacionar con una separación de píxeles como se divulga anteriormente.

Dichas mediciones se pueden repetir tantas veces como se desee para producir información de calibración exacta. Se ha descubierto que la información de calibración producida de esta manera es repetible a más de 500 nm, y el contacto entre el aplicador de muestras y el sustrato introduce no más de 1 micrómetro de deflexión con respecto al sustrato. Los rasgos característicos y aspectos adicionales del uso de actuadores con cojinetes de aire para la calibración se divulgan, por ejemplo, en un documento titulado "Force Generation and Measurement", de Kevin McCarthy, publicado en Drives & Controls (marzo de 2002), y disponible en Dover Motion en Internet en http://www.dovermotion.com/WhitePapersPage.aspx, sus contenidos completos se incorporan en el presente documento por referencia. Además, mientras que los servomotores se pueden usar con el manipulador 150 o plataforma 152 para implementar la técnica de calibración de detección táctil de superficie, se pueden usar otros tipos de motores (por ejemplo, motores paso a paso) para llevar a cabo la técnica.

A modo de ejemplo, el procedimiento de calibración de detección táctil de superficie anterior se puede realizar en la inicialización de un sistema de preparación de muestras automatizado, en momentos predeterminados durante el funcionamiento normal o el mantenimiento de dicho sistema, o al recibir un mensaje de error del sistema relacionado con la calidad de un muestra preparada sobre un sustrato (por ejemplo, una estación de imágenes de baja o alta ampliación no puede identificar o contar con exactitud uno o más componentes dentro de una muestra).

Determinación del grosor del sustrato

Los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento también se pueden usar para determinar el grosor del sustrato, por ejemplo, un portaobjetos, comparando las posiciones del vértice de las imágenes reflejadas desde las superficies superior e inferior de un sustrato transparente.

El procedimiento divulgado anteriormente en el diagrama de flujo 600 también se puede usar para determinar una posición del vértice de la imagen del aplicador de muestras que se refleja desde la superficie inferior 102b del sustrato 102 (es decir, la segunda imagen reflejada 710 en la segunda región de imagen reflejada 707). Como se muestra en la FIG. 7B, por ejemplo, al igual que existe una diferencia significativa entre el nivel de contraste para las filas de píxeles que no corresponden a la imagen reflejada y las filas de píxeles que corresponden a la primera imagen reflejada 708, también existe típicamente una diferencia significativa entre el nivel de contraste para las filas de píxeles que corresponden a la superposición de la primera imagen reflejada 708 y la segunda imagen reflejada 710, y las filas de píxeles que corresponden solo a la primera imagen reflejada 708. La posición del vértice para la segunda imagen reflejada 710 se indica como el punto 728 en las FIGS. 7B y 7C.

Con referencia a la FIG. 7C, la separación entre las posiciones del vértice 726 y 728, μt, se puede calcular a continuación para proporcionar una indicación del grosor del sustrato 102. Como se divulga anteriormente con respecto a la separación μh, el valor de μt - determinado en unidades de píxeles a partir de la imagen en la FIG. 7C - se puede convertir en unidades lineales usando la información de calibración adecuada, que se puede obtener de una manera similar al procedimiento descrito anteriormente, o en una variedad de otras formas, incluyendo el modo de realización de una serie de experimentos de calibración con sustratos de grosor conocido para ensamblar un tabla de calibración de valores medidos de μt y los correspondientes grosores conocidos t. Durante el funcionamiento posterior de los sistemas divulgados en el presente documento, un grosor t correspondiente a un valor medido de μt se puede interpolar a partir de los valores en la tabla de calibración.

Selección de una altura del aplicador apropiada para distribuir una distribución de muestra deseada

En la descripción anterior, el aplicador de muestras 100 se sitúa a una altura fija h por encima de la superficie superior 102a del sustrato 102 mientras que la separación μh se determina a partir de una imagen como la mostrada en la FIG. 7C. El aplicador de muestras 100 se puede conectar mecánicamente a un manipulador que controla la traslación del manipulador de muestras 100 en tres dimensiones coordinadas. En el modo de realización mostrado en la FIG. 1A, por ejemplo, el aplicador de muestras 100 está conectado al manipulador 150. Asociado con el manipulador 150 hay un sistema de coordenadas que corresponde a los ejes a lo largo de los cuales se puede trasladar el aplicador de muestras 100. Por ejemplo, el aplicador de muestras 100 se puede trasladar a lo largo de una dirección de la coordenada z del manipulador 150, que se extiende paralelo al eje central 108 del aplicador de muestras 100, para variar la altura h del aplicador de muestras por encima de la superficie superior 102a del sustrato 102. Además, el aplicador de muestras 100 se puede trasladar a lo largo de las direcciones de las coordenadas x e y, cada una de las cuales es perpendicular a la dirección de la coordenada z. Las direcciones de las coordenadas x e y son cada una paralelas a un plano orientado perpendicular al eje central 108. Cuando el ángulo de inclinación θ del sustrato 102 es cero, las direcciones de las coordenadas x e y también son paralelas al plano formado por el sustrato 102; trasladando el aplicador de muestras 100 en una o ambas direcciones de las coordenadas x e y, por lo tanto, posiciona el aplicador de muestras en una nueva localización con respecto al sustrato 102, pero no cambia la altura h del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102.

De forma alternativa, en algunos modos de realización, la plataforma 152 se puede usar para trasladar el sustrato 102

en las direcciones de las coordenadas x, y y z con respecto al aplicador de muestras 102. Además, en determinados modos de realización, tanto la plataforma 152 como el manipulador 150 se pueden usar para trasladar el aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102, con el movimiento en las direcciones de la coordenadas x, y, y z distribuidas entre la plataforma 152 y el manipulador 150. En la siguiente divulgación, se analiza el ajuste de la altura del aplicador de muestras por medio del manipulador 150; sin embargo, se debe entender que los procedimientos divulgados también se pueden implementar por medio del ajuste de la altura del aplicador de muestras 100 usando solo la plataforma 152, o usando la plataforma 152 en combinación con el manipulador 150.

En los procedimientos divulgados anteriormente para determinar la separación μh, el aplicador de muestras 100 permanece tanto a una altura fija como a una localización fija con respecto al sustrato 102. Sin embargo, como se analiza anteriormente, la experimentación cuidadosa ha determinado alturas adecuadas para distribuir determinados líquidos sobre determinados sustratos. En particular, se ha determinado que para distribuir sangre sobre portaobjetos para formar una película que tiene aproximadamente un grosor de una célula, el aplicador de muestras 100 se debe mantener a una altura de aproximadamente 12 micrómetros por encima de la superficie del portaobjetos. Este valor de altura se determinó para una tasa específica de distribución de muestra (por ejemplo, tasa de traslación del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102) y para una viscosidad de muestra específica. Más en general, el aplicador de muestras 100 se debe mantener a una altura de entre 8 micrómetros y 20 micrómetros por encima de la superficie del portaobjetos (por ejemplo, a una altura de aproximadamente 8 micrómetros, aproximadamente 10 micrómetros, aproximadamente 12 micrómetros, aproximadamente 14 micrómetros) cuando se distribuye sangre sobre portaobjetos.

En general, los siguientes factores influyen en la capacidad de distribuir una muestra uniformemente sobre un sustrato en una distribución uniforme y, por lo tanto, tienen un efecto sobre la altura apropiada del aplicador de muestras por encima de la superficie del sustrato:

(1) el caudal de la muestra distribuida desde el aplicador debe ser igual al volumen deseado de muestra que se va a distribuir durante el período de distribución de la muestra;

(2) a medida que se incrementa la tasa de traslación del aplicador de muestras con respecto al sustrato, la altura del aplicador por encima del sustrato debe disminuir proporcionalmente (aunque la relación de proporcionalidad puede no ser lineal, y la altura del aplicador no debe disminuir por debajo de una altura mínima por debajo de la cual se produce daño en las células);

(3) a medida que se incrementa la viscosidad de la muestra con respecto a la tensión de superficie de la muestra distribuida por encima del sustrato, la altura del aplicador por encima de la superficie del sustrato debe disminuir para evitar perturbaciones o "desgarros" en el flujo de la muestra a medida que se deposita en el sustrato;

(4) a medida que se incrementa la humectabilidad del sustrato, la altura del aplicador de muestras por encima del sustrato debe disminuir para mantener debajo del aplicador un volumen constante de la muestra que se distribuye sobre el sustrato;

(5) a medida que se incrementa el diámetro interno del aplicador de muestras, la altura del aplicador por encima del sustrato debe disminuir (aunque no por debajo de la altura mínima por debajo de la cual se produce daño en las células) para mantener debajo del aplicador un volumen constante de la muestra que se distribuye sobre el sustrato; y

(6) la proporción del diámetro interior del aplicador de muestras con respecto al diámetro exterior del aplicador de muestras se debe seleccionar para garantizar que se apliquen tensiones de cizallamiento a las células dentro del aplicador y entre el aplicador y el sustrato (por ejemplo, dentro de una caída pendiente en el aplicador y tocando el sustrato durante el depósito de la muestra) no distorsiona la morfología de las células (a medida que esta proporción se incrementa, se aplica menos cizallamiento a las células durante la distribución de la muestra sobre la superficie del sustrato).

En algunos modos de realización, para garantizar que el aplicador de muestras 100 se sitúa a una altura adecuada por encima del sustrato 102 cuando el líquido 104 se distribuye más tarde sobre el sustrato, el aplicador de muestras 100 se mantiene en una localización específica con respecto al sustrato 102 (por ejemplo, en una posición particular de las coordenadas x e y en el sistema de coordenadas del manipulador), y la altura del aplicador de muestras 100 por encima del sustrato 102 varía (por ejemplo, el aplicador de muestras 100 se traslada a lo largo de la dirección de la coordenada z en el sistema de coordenadas del manipulador 150). En cada nueva configuración de la altura del manipulador, se repiten las etapas divulgadas anteriormente en los diagramas de flujo 400 y 600 para determinar la separación μh.

A continuación, usando información de calibración que relaciona la separación entre imágenes μh medida con la altura real h del aplicador de muestras 100 por encima del sustrato 102 y/o con configuraciones de control particulares de manipulador 150, se selecciona una configuración de control adecuada para el manipulador para proporcionar una altura del aplicador de muestras que corresponda a la altura del aplicador objetivo deseada en una localización particular del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102.

Este procedimiento se ilustra con referencia a la FIG. 8, que muestra una curva de calibración 800 que relaciona las configuraciones de control V_1 del manipulador 150 (o plataforma 152) con una serie de separaciones entre imágenes μh medidas. Para generar los puntos mostrados en la FIG. 8, el aplicador de muestras 100 se situó en una serie de seis alturas diferentes por encima de la superficie superior 102a del sustrato 102 aplicando seis configuraciones de control diferentes al manipulador 150 (o plataforma 152) usando la unidad de control 160. La localización del aplicador de muestras 100 en el plano x-y con respecto al sustrato 102 fue la misma para cada altura diferente (a lo largo del eje z). En cada altura diferente, se obtuvo una imagen por el detector 106 que mostraba tanto una imagen directa del aplicador de muestras 100 como una imagen reflejada del aplicador de muestras 100. Se determinó la separación entre las imágenes directa y reflejada, μh. Las seis separaciones entre imágenes medidas, μh_1-μh_6, se representan en el eje vertical de la FIG. 8 como una función de las seis configuraciones de control V_1-V_6 diferentes aplicadas al manipulador 150 (o plataforma 152) para situar el aplicador de muestras 100 en las seis alturas diferentes.

A partir de la información de calibración previamente determinada, se sabe que la separación objetivo μh_t corresponde a la altura objetivo h_t deseada del aplicador de muestras 100 por encima del sustrato 102. Por ejemplo, para distribuir una muestra de sangre en un portaobjetos, las etapas de calibración previas han determinado que la altura del aplicador de muestras objetivo h_t por encima de la superficie del sustrato 102 (por ejemplo, 12 micrómetros) corresponde a una posición particular de la coordenada z del manipulador 150 (o plataforma 152). Como se muestra en la FIG. 8, la separación objetivo μh_t se encuentra entre las separaciones μh_3 y μh_4 medidas, que corresponden a las configuraciones de control de manipulador (o plataforma) V_3 y V_4, respectivamente.

Para determinar la configuración de control de manipulador (o plataforma) que proporciona la altura del aplicador de muestras objetivo h_t (por ejemplo, 12 micrómetros), se puede usar la interpolación entre los puntos medidos (V,μh). En particular, la interpolación entre puntos (V_3,μh_3) y (V_4,μh_4) se puede usar para determinar la configuración de control V_t que proporciona la separación objetivo μh_t. Como la separación objetivo μh_t corresponde a la altura del aplicador objetivo h_t, la configuración de control V_t aplicada al manipulador 150 (o plataforma 152) proporciona la altura del aplicador de muestras objetivo h_t deseada.

Aunque se usaron un total de seis configuraciones de manipulador (o plataforma) diferentes en la FIG. 8 para determinar configuración de control V_t objetivo, más en general, se puede usar cualquier número de configuraciones de la altura del manipulador (o plataforma). Por ejemplo, el número de configuraciones de la altura del aplicador de muestras (que es el mismo que el número de configuraciones de control de manipulador o plataforma) puede ser de 2 o más (por ejemplo, de 3 o más, 4 o más, 6 o más, 8 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más).

Para una localización particular del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102, el procedimiento divulgado en el presente documento proporciona una configuración de control V_t del manipulador (o plataforma) que garantizará que el aplicador de muestras 100 se sitúe a una altura deseada por encima de la superficie superior 102a del sustrato 102 en esa localización. Como se muestra en la FIG. 9, el procedimiento divulgado anteriormente se puede repetir para múltiples localizaciones diferentes 902, 904, 906 y 908 del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102. En cada localización, la altura del aplicador de muestras por encima del sustrato 102 se puede variar trasladando el manipulador 150 (o plataforma 152) a lo largo del eje de coordenadas z del manipulador aplicando diferentes configuraciones de control al manipulador (o plataforma). Las separaciones entre imágenes μh medidas a las diferentes alturas se pueden usar para determinar una configuración de control V_t objetivo del manipulador (o plataforma) que garantizará que el aplicador de muestras 100 se sitúe a una altura deseada por encima del sustrato 102 en esa localización.

Se pueden determinar configuraciones de control adecuadas en cualquier número de localizaciones del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102. En la FIG. 9, la configuración de control adecuada se determina en cuatro localizaciones diferentes. Sin embargo, más en general, el número de localizaciones puede ser de uno o más (por ejemplo, de dos o más, tres o más, cuatro o más, seis o más, ocho o más, diez o más, 15 o más, 20 o más, o 30 o más).

Después de que se hayan determinado configuraciones de control adecuadas en un número fijo de localizaciones, se pueden estimar configuraciones de control adecuadas en otras localizaciones usando, por ejemplo, técnicas de interpolación. Por ejemplo, en referencia a la FIG. 9, se determinan configuraciones de control V_t adecuadas en las localizaciones 902 y 904. Una configuración de control V_t adecuada que proporciona una altura del aplicador de muestras de, por ejemplo, 10 micrómetros, por encima del sustrato 102 se puede estimar en la localización 903 por interpolación entre las configuraciones de control determinadas en las localizaciones 902 y 904.

El grosor del sustrato 102 también se puede medir en cualquiera de las localizaciones 902, 904, 906 y 908 usando las etapas divulgadas anteriormente con respecto al diagrama de flujo 600. En particular, la separación μt entre las dos imágenes reflejadas del aplicador de muestras 100 solo se necesita determinar una vez en cada localización; esta separación no cambia a medida que el aplicador de muestras 100 se traslada a lo largo del eje de coordenadas z del manipulador 150 (o plataforma 152). En consecuencia, μt se puede determinar a una altura individual. La separación entre imágenes μt se puede convertir para proporcionar un grosor t medido en unidades lineales (por ejemplo, micrómetros) usando la información de calibración si se desea.

Con configuraciones de control adecuadas para el manipulador (o plataforma) determinadas en localizaciones específicas del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102, el manipulador 150 (o plataforma 152) se puede situar de modo que el aplicador de muestras 100 se sitúe en cualquier localización con respecto al sustrato 102, y la altura del aplicador de muestras por encima de la superficie superior del sustrato se puede mantener a un valor deseado. Por tanto, el líquido 104 se puede distribuir desde casi una altura constante por encima del sustrato 102, garantizando que las filas del líquido distribuido sean lo más uniformes posible. De esta manera, las muestras producidas son de mayor uniformidad que las producidas usando, por ejemplo, procedimientos manuales.

Determinación de la orientación del sustrato

En algunos modos de realización, se puede determinar la orientación del sustrato 102. Con referencia a la FIG. 1B, determinar la orientación del sustrato 102 puede incluir determinar el ángulo de inclinación θ entre el plano definido por el sustrato 102 y un plano ortogonal al eje central 108 del aplicador de muestras 100. La determinación de la orientación del sustrato 102 también puede incluir la determinación de parámetros asociados con una ecuación $f(x,y)$ que describe la superficie superior 102a del sustrato 102 como una función de la posición en el plano de coordenadas (x,y) del manipulador 150 (o plataforma 152). En general, la orientación de un plano se puede determinar cuando son conocidos tres puntos en el plano. En consecuencia, cuando el número de configuraciones de control almacenadas (que típicamente corresponde al número de localizaciones distintas del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102 en el que se determinan las configuraciones de control) es de tres o más, se puede determinar la ecuación del plano que describe la superficie 102a directamente desde la configuración de control almacenada. En algunos modos de realización, las configuraciones de control almacenadas se convierten en primer lugar en valores de desplazamiento expresados en unidades lineales (por ejemplo, micrómetros) usando información de calibración, y a continuación los valores de desplazamiento se usan para determinar los coeficientes de la ecuación del plano de la superficie 102a. Se ha observado que, como resultado de la pendiente del plano del sustrato 102 soportado por la plataforma 152, la coordenada vertical de la superficie 102a del sustrato (en el sistema de coordenadas del manipulador 150 o plataforma 152) puede variar en tanto como 30 micrómetros entre localizaciones en (x,y) en extremos opuestos del sustrato. La ecuación del plano que describe la superficie 102a también se puede usar, por ejemplo, para determinar el ángulo de inclinación de la superficie 102a. Además, con cuatro o más configuraciones de control almacenadas, es posible rastrear sustratos de superficie no planos, tal como un sustrato ligeramente curvado, ajustando una ecuación más compleja $f(x,y)$ que describe una superficie curva con respecto a los valores de las configuraciones de control. Los procedimientos para determinar una ecuación de un plano que describe o es con respecto a una superficie se encuentran en la solicitud de patente de EE. UU. en tramitación n.º 13/019.118, presentada el 1 de febrero de 2011, su contenido completo se incorpora en el presente documento por referencia.

Distribución de líquido - Otras consideraciones

Para crear capas de alta calidad uniformes de una muestra que se ha distribuido sobre la superficie del sustrato, una consideración importante es en general la altura del aplicador de muestras por encima de la superficie del sustrato. Elegir una altura adecuada (por ejemplo, 12 micrómetros) y mantener la altura lo más constante posible a medida que se distribuyen filas de líquido sobre el sustrato es típicamente un factor significativo para garantizar que se obtienen muestras uniformes y repetibles. Los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento están diseñados para garantizar que la altura del aplicador de la muestra se pueda determinar con exactitud y mantener lo más constante posible durante la distribución.

Sin embargo, más en general, una variedad de factores interrelacionados desempeñan un papel en la determinación de la uniformidad y calidad de las muestras obtenidas de la distribución de líquido. La influencia que ejercen estos factores está relacionada con diversos fenómenos físicos que se producen durante el depósito del líquido que contiene células sobre un sustrato.

Uno de dichos fenómenos físicos que se produce durante el depósito de líquido es la formación de vórtices dentro de la punta del aplicador 100. La FIG. 11 muestra un diagrama esquemático del aplicador de muestras 100 que distribuye líquido 104 sobre la superficie del sustrato 102. El líquido 104 en general fluye de forma descendente en el sentido de la flecha 2002 a través del aplicador 100 y sobre el sustrato 102. Sin embargo, se ha descubierto que durante la distribución de líquido y dentro del aplicador 100, el líquido recircula en un sentido indicado por la flecha 2004, formando un vórtice de líquido dentro del aplicador 100. La formación de vórtice se produce típicamente debido a diversas fuerzas de fricción que se aplican al líquido 104 a medida que fluye a través del aplicador 100 y entra en contacto con la superficie del sustrato 102.

La formación del vórtice presenta varios obstáculos para el depósito uniforme de líquido sobre el sustrato 102. Por ejemplo, las filas de líquido distribuido a través del aplicador 100 pueden ser no uniformes, ya que la distribución del líquido dentro de la fila se ve afectada por la recirculación dentro del vórtice. Además, determinados tipos de células tales como plaquetas pueden quedar atrapadas dentro del vórtice, dando lugar al depósito no uniforme de estas células sobre el sustrato 102. En casos extremos, diferentes tipos de células pueden quedar atrapadas en grados variables dentro del vórtice, de modo que la distribución de células en el líquido distribuido en la superficie del sustrato 102 ya no puede reflejar la distribución dentro del líquido a granel.

Además, también se pueden activar células tales como plaquetas por recirculación dentro del vórtice; dicha activación puede dar lugar a la coagulación de plaquetas, lo que evita la dispersión uniforme de las plaquetas en la superficie del sustrato 102. Típicamente, las plaquetas activadas también se tiñen de manera diferente y presentan un menor contraste en las imágenes de muestra en comparación con las plaquetas inactivadas, lo que las hace más difíciles de localizar o distinguir de otros componentes de muestra en las imágenes.

Otro fenómeno que puede afectar a la calidad de las muestras preparadas es la tensión de cizallamiento que se produce durante la distribución de líquido. Cuando el aplicador de muestras 100 se mueve con respecto al sustrato 102 a lo largo del sentido indicado por la flecha 2006 en la FIG. 11, la tensión de cizallamiento se aplica al líquido debajo del borde delantero 2008 y el borde trasero 2010 del aplicador 100. En general, las fuerzas de cizallamiento son mayores bajo el borde delantero 2008 en comparación con las fuerzas de cizallamiento bajo el borde trasero 2010. Cuanto mayor es la duración de la distribución de líquido, más células en el líquido se ven afectadas por las fuerzas de cizallamiento. En general, las células sometidas a fuerzas de cizallamiento están distorsionadas, y la morfología de dichas células se puede alterar permanentemente. Si las fuerzas de cizallamiento son suficientemente fuertes, las células se pueden romper. Los cambios permanentes en la morfología celular pueden afectar a la medida en que se puede extraer información de diagnóstico y métricas cuantitativas útiles de las imágenes celulares. Las fuerzas de cizallamiento también pueden activar determinados tipos de células tales como plaquetas; como se analiza anteriormente las plaquetas activadas se tiñen de manera diferente y presentan un menor contraste en las imágenes de muestra en comparación con las plaquetas inactivadas, lo que las hace más difíciles de localizar en las imágenes de muestra.

Otro fenómeno que puede afectar a la calidad de las muestras preparadas es la medida en que las células se agregan en el aplicador de muestras antes de distribuirse sobre el sustrato 102. Los glóbulos rojos tienen una afinidad natural débil entre sí y tienden a agregarse en mayor medida en un líquido más rico en glóbulos rojos que en un líquido donde están más diluidos. Como resultado, la agrupación y el apilamiento de los glóbulos rojos tiende a producirse en mayor medida en las primeras filas de líquido que se distribuyen sobre el sustrato 102 que en las últimas filas, porque las últimas filas se distribuyen del líquido con un número más pequeño de células. Como resultado, el apilamiento de glóbulos rojos se puede producir con mayor frecuencia en una parte de la muestra preparada que en otras, lo que dificulta obtener resultados de análisis cuantitativos fiables.

Aún otro fenómeno que puede afectar a la calidad de las muestras preparadas es el grado en que las filas de líquido distribuido se secan antes de que se distribuya una fila adyacente. Los glóbulos rojos naturalmente tienen una palidez central deprimida que es fácilmente visible en las imágenes celulares. Si los glóbulos rojos se secan a una tasa adecuada en el sustrato, esta morfología se conserva para su análisis. Sin embargo, si los glóbulos rojos se secan muy lentamente, se pueden distorsionar de su conformación natural, de modo que se pierde la palidez central deprimida. Las células distorsionadas pueden adoptar una variedad de conformaciones diferentes, incluyendo la formación de las llamadas "células diana". Las células diana son glóbulos rojos para los que la conformación de la célula ha cambiado, y en particular, una parte de la palidez central ha cambiado de conformación, de modo que cuando se toman imágenes, se observan regiones concéntricas de diferente grosor, dando a las células la apariencia de una "diana". Estas conformaciones no reflejan la verdadera conformación de los glóbulos rojos en muestras inalteradas. Como tal, la formación de células diana dificulta la extracción de información cuantitativa fiable de una muestra. Además, determinadas afecciones de enfermedad dan lugar naturalmente a la formación de células diana, y la observación de dichas células puede ser un marcador diagnóstico importante para esas afecciones, pero solo si la formación de células diana no es un subproducto de la preparación de la muestra.

La tasa de secado del líquido depositado está influenciada por factores tales como humedad relativa, temperatura y la composición del líquido. Algunos de estos factores se pueden controlar durante el depósito de líquido. Además, otros factores, tales como la tasa de depósito y superposición de líquido entre filas sucesivas, se pueden controlar para regular el grado en que una fila de líquido depositada se seca antes de que se aplique una fila sucesiva a la superficie del sustrato. Un aspecto importante del depósito de líquido es el mantenimiento de un "borde húmedo" durante la aplicación de filas sucesivas. Es decir, si una primera fila depositada se deja secar durante demasiado tiempo antes de que se aplique una fila sucesiva, las filas de líquido no se mezclarán apropiadamente para formar una distribución homogénea de células en la superficie del sustrato. En cambio, los bordes de las filas depositadas pueden aparecer más oscuros que las partes centrales debido a la acumulación de células en estas regiones. Además, las células cerca de los bordes de las filas pueden sufrir hemólisis y/o perder su conformación natural (por ejemplo, la palidez central deprimida), de modo que la conformación de las células secas ya no es representativa de las células en su estado inalterado.

La influencia de los factores anteriores se puede mitigar controlando diversos parámetros asociados con el procedimiento de distribución de líquido y rasgos característicos del aplicador de muestras en combinación con el mantenimiento de una altura del aplicador constante. Como se analiza previamente, un parámetro importante es la altura del aplicador de muestras sobre la superficie del sustrato, que se puede determinar y mantener con exactitud usando los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento.

Por ejemplo, los procedimientos y sistemas permiten que el aplicador de muestras se mantenga a una altura de aproximadamente 12 micrómetros (por ejemplo, entre 9 y 15 micrómetros, entre 10 y 13 micrómetros, entre 11 y 14

micrómetros, entre 12 y 15 micrómetros) por encima de la superficie del sustrato durante la distribución de líquido.

Además, los procedimientos y sistemas permiten mantener que la altura del aplicador de la muestra se mantenga dentro de un intervalo relativamente estrecho; es decir, los procedimientos y sistemas son lo suficientemente exactos para que solo se produzcan desviaciones relativamente pequeñas en la altura del aplicador cuando el aplicador se traslada con respecto al sustrato. Típicamente, durante el depósito de líquido, se establece o determina una altura del aplicador objetivo (por ejemplo, una altura del aplicador objetivo de 12 micrómetros) y durante el depósito de líquido, el aplicador se mantiene dentro de un intervalo de alturas centradas alrededor de la altura objetivo. En algunos modos de realización, por ejemplo, el aplicador se mantiene dentro de 2 micrómetros (por ejemplo, dentro de 1,7 micrómetros, dentro de 1,5 micrómetros, dentro de 1,3 micrómetros, dentro de 1,0 micrómetros, dentro de 0,8 micrómetros, dentro de 0,6 micrómetros, dentro de 0,4 micrómetros, dentro de 0,2 micrómetros) de la altura objetivo del aplicador con respecto a la superficie del sustrato.

A continuación se analizan otros rasgos característicos y parámetros que se pueden controlar o ajustar para afectar a la calidad de las muestras preparadas.

La elección de una combinación de parámetros para la distribución de líquido refleja el equilibrio de una variedad de aspectos del funcionamiento del sistema para producir muestras de alta calidad en tiempos de procesamiento relativamente cortos. Debido a que una variedad de fenómenos y factores influyen en la calidad global de las muestras, determinar una combinación particular de parámetros implica más que simplemente optimizar estos parámetros uno por uno. Por el contrario, se determinan combinaciones de diferentes intervalos de parámetros y a continuación se usan para el depósito de líquido para lograr muestras de calidad suficientemente alta. Las combinaciones seleccionadas de parámetros tienen en cuenta el hecho de que el procedimiento de depósito implica más que simplemente aplicar un líquido a la superficie del sustrato. El líquido que se aplica actúa como vehículo de glóbulos sanguíneos, y la combinación de parámetros que se usa debería ser suficiente para proporcionar una muestra en la que la distribución de las células sea uniforme y las células retengan, en la medida de lo posible, sus conformaciones originales. Como tal, la determinación de las combinaciones de parámetros es un procedimiento más complejo que el procedimiento que se requeriría para optimizar simplemente el depósito de un líquido que no contiene células.

(i) Conformación de la pared del aplicador

En algunos modos de realización, la conformación en sección transversal de la pared del aplicador se puede modificar para ayudar a controlar la cantidad de fuerza de cizallamiento aplicada a las células en el líquido durante la distribución. Por ejemplo, en algunos modos de realización, la pared del aplicador se puede biselar para reducir la distancia (por ejemplo, el grosor de la pared) sobre la que se aplican fuerzas de cizallamiento al líquido. Aunque biselar la pared reduce la cantidad de tiempo durante el que las células se someten a fuerzas de cizallamiento durante la distribución, la pared biselada incrementa la magnitud de la fuerza de cizallamiento aplicada. Por tanto, la conformación del bisel se puede seleccionar para garantizar que tanto el tiempo como la magnitud de la fuerza de cizallamiento aplicada sean insuficientes para dañar permanentemente los glóbulos rojos en el líquido.

En general, el grosor de la pared del aplicador se selecciona para reducir las fuerzas de cizallamiento aplicadas a las células (por ejemplo, los grosores de pared más delgados reducen las fuerzas de cizallamiento) y para proporcionar estabilidad estructural al aplicador (por ejemplo, los grosores de pared más gruesos potencian la estabilidad). En algunos modos de realización, por ejemplo, el grosor de la pared del aplicador puede estar entre 30 micrómetros y 300 micrómetros (por ejemplo, entre 40 micrómetros y 200 micrómetros, entre 50 micrómetros y 175 micrómetros, entre 60 micrómetros y 150 micrómetros, entre 70 micrómetros y 125 micrómetros).

(ii) Dimensiones y materiales del aplicador de muestras

La rugosidad en la superficie interior del aplicador de muestras 100 puede dañar las células presentes en el líquido que se distribuye sobre el sustrato 102. Se pueden usar diversos procedimientos para mitigar los efectos de la rugosidad de la superficie. En algunos modos de realización, si el diámetro interior del aplicador 100 es suficientemente grande, se puede bombear una suspensión que incluye, por ejemplo, perlas de silicio, a través del aplicador 100 para suavizar cualquier imperfección de la superficie.

Típicamente, el aplicador de muestras 100 está formado de un material extrudido, tal como metal o plástico. En determinados modos de realización, se puede obtener una superficie interna lisa fabricando el aplicador 100 de un material tal como vidrio que se extrude para formar una superficie interior muy lisa. En algunos modos de realización, el aplicador 100 puede incluir un eje formado de un material metálico extrudido, y una punta concéntrica formada de un material tal como vidrio con una superficie interior extrudida lisa. Un aplicador de este tipo tiene la mayoría de las ventajas que surgen del uso de un aplicador de metal (por ejemplo, fabricación económica), pero al mismo tiempo disfruta del beneficio de una superficie interior lisa provista por la punta de vidrio.

El diámetro interior del aplicador de muestras también se puede seleccionar para mitigar algunos de los fenómenos descritos anteriormente. Por ejemplo, al usar un aplicador de muestras con un diámetro interior de entre 200 micrómetros y 650 micrómetros inclusive (por ejemplo, entre 200 micrómetros y 300 micrómetros, entre 200

micrómetros y 400 micrómetros, entre 300 micrómetros y 400 micrómetros, entre 400 micrómetros y 650 micrómetros, entre 500 micrómetros y 650 micrómetros), se puede reducir el pellizco de las células dentro del aplicador a medida que se distribuye el líquido. El pellizco puede dar lugar a una distorsión permanente de la morfología de las células.

En determinados modos de realización, la proporción del diámetro exterior ("DO") con respecto al diámetro interior ("DI") del aplicador de muestras se controla para reducir las fuerzas de cizallamiento durante la distribución de líquido. En general, cuanto más pequeña sea la proporción de DO con respecto a DI, más pequeña es el área en sección transversal del aplicador y, por lo tanto, más pequeña es la magnitud de las fuerzas de cizallamiento aplicadas a las células. Por ejemplo, la proporción DO/DI puede tener una magnitud de 1,5 o menos (por ejemplo, 1,4 o menos, 1,3 o menos, 1,2 o menos, 1,1 o menos) para mantener las fuerzas de cizallamiento dentro de límites aceptables.

En algunos modos de realización, para reducir las fuerzas de cizallamiento durante la distribución de líquido, el aplicador de muestras 100 puede incluir un recubrimiento en su superficie exterior y/o interior. Los recubrimientos adecuados pueden estar formados de materiales tales como Teflon®, cerámica y metales.

En determinados modos de realización, la conformación del aplicador de muestras 100 se puede seleccionar para reducir la formación de vórtices y/o tensiones de cizallamiento cuando el aplicador se traslada con respecto a la superficie del sustrato 102. En general, un aplicador con un diámetro interno más pequeño puede reducir el tamaño del vórtice, reduciendo de este modo la fuerza de cizalla aplicada a la muestra cuando se distribuye sobre el sustrato. La FIG. 12A es una vista en sección transversal de un aplicador de muestras 100 con un perfil con reborde o escalonado en la punta del aplicador. El líquido se distribuye a través de la abertura circular estrecha 2050 adyacente al reborde. A través de una cuidadosa experimentación, se ha descubierto que los modos de realización del aplicador 100, tales como el ejemplo mostrado en la FIG. 12A han mejorado la calidad de las muestras preparadas en comparación con las muestras preparadas con aplicadores del mismo diámetro interno y externo sin una punta aplicadora con reborde o escalonada.

La FIG. 12B es un diagrama esquemático que muestra una vista de extremo de un aplicador de muestras 100 con una abertura ovalada 2100 a través de la que se distribuye líquido sobre un sustrato. La dimensión menor d de la abertura ovalada está orientada paralela a la dirección de traslación. En algunos modos de realización, la dimensión menor d puede ser de al menos 200 micrómetros (por ejemplo, al menos 250 micrómetros, al menos 300 micrómetros, al menos 400 micrómetros, al menos 500 micrómetros), por ejemplo.

(iii) Volumen del aplicador de muestras

En algunos modos de realización, se usa una bomba de jeringa para iniciar y mantener el flujo de líquido a través del aplicador de muestras 100 y sobre el sustrato 102. En general, se puede usar una variedad de diferentes tipos de bombas de jeringa. Por ejemplo, se pueden usar una o más bombas basadas en motores paso a paso para regular el flujo de líquido. Sin embargo, cuando se usa una bomba basada en un motor paso a paso con una capacidad de volumen particular para distribuir un volumen de líquido que es significativamente más pequeño que la capacidad de la bomba, incluso las inhomogeneidades relativamente pequeñas en el desplazamiento de un pistón de accionamiento dentro de la bomba pueden dar como resultado volúmenes no uniformes de líquido que se distribuyen sobre el sustrato 102. Para mitigar dichos efectos, se pueden usar bombas con capacidad de volumen más pequeña para distribuir líquidos. Por ejemplo, para distribuir entre 0,8 µl y 1,2 µl de líquido sobre un sustrato, una bomba de 12,5 µl típicamente proporciona muestras de mayor calidad que una bomba de 25 µl.

(iv) Velocidad de traslación del aplicador de muestras

Como se analiza anteriormente, los glóbulos rojos tienden a agregarse cuando están presentes en grandes cantidades, dando lugar a un apilamiento que puede ser más frecuente en las primeras filas de líquido distribuido que en últimas filas distribuidas, lo que da lugar a una distribución no homogénea de glóbulos rojos en el superficie del sustrato. Para mitigar el apilamiento de células, se puede incrementar la tasa a la que se traslada el aplicador de muestras con respecto a la superficie del sustrato. En general, el aplicador de muestras se puede trasladar con respecto a la superficie del sustrato utilizando una variedad de técnicas. Por ejemplo, en algunos modos de realización, la plataforma 152, que soporta el sustrato, se traslada, mientras que el aplicador de muestras permanece esencialmente fijo en su posición. En determinados modos de realización, el manipulador 150 traslada el aplicador mientras el sustrato montado en la plataforma 152 permanece esencialmente fijo en su posición. En algunos modos de realización, tanto el aplicador como el sustrato se trasladan por el manipulador 150 y la plataforma 152, respectivamente. Cada una de las técnicas anteriores da como resultado la traslación del aplicador de muestras con respecto a la superficie del sustrato. Además, se debe entender que a menos que se divulgue específicamente de otro modo en el presente documento, las referencias a "trasladar" el aplicador implican una traslación relativa del aplicador con respecto al sustrato, y se pueden implementar trasladando el aplicador mientras el sustrato permanece esencialmente fijo en su posición, trasladando el sustrato mientras el aplicador permanece esencialmente fijo en su posición, y trasladando tanto el aplicador como el sustrato.

En algunos modos de realización, la velocidad de traslación relativa entre el aplicador 100 y el sustrato 102 puede estar entre 40 mm/s y 90 mm/s (por ejemplo, entre 50 mm/s y 80 mm/s, entre 60 mm/s y 70 mm/s) para reducir o

eliminar significativamente el apilamiento de glóbulos rojos en las muestras preparadas.

(v) Tasa de distribución de líquido

Como se analiza anteriormente, las células diana se forman cuando los glóbulos rojos se secan muy lentamente después de distribuirse en la superficie del sustrato 102. Para reducir o eliminar la formación de células diana y la pérdida de la conformación de la palidez central de los glóbulos rojos, la tasa de secado celular se puede controlar ajustando la tasa de distribución de líquido a través del aplicador 100. Ajustar la tasa de distribución a un valor adecuadamente alto también ayuda a evitar el apilamiento de células. En algunos modos de realización, por ejemplo, la tasa de distribución de líquido a través del aplicador 100 es de 0,020 µl/s o más (por ejemplo, 0,030 µl/s o más, 0,035 µl/s o más, 0,040 µl/s o más, 0,050 µl/s o más, 0,060 µl/s o más, 0,070 µl/s o más, 0,075 µl/s o más, 0,080 µl/s o más, 0,090 µl/s o más, 0,100 µl/s o más) para reducir la formación de células diana y el apilamiento de células en las muestras preparadas. En determinados modos de realización, se pueden usar intervalos de tasas de distribución de líquido que se encuentran dentro de los intervalos divulgados anteriormente. Por ejemplo, la tasa de distribución de líquido a través del aplicador 100 puede estar entre 0,035 µl/s y 0,075 µl/s.

Más en general, la tasa de distribución de líquido y la velocidad de traslación relativa del aplicador coinciden entre sí para proporcionar muestras de calidad suficiente. Se ha descubierto que si el aplicador se traslada con respecto a la superficie del sustrato a una tasa que es demasiado alta con respecto a la tasa de distribución de líquido, entonces el líquido se "extrae" del aplicador, dando como resultado una distribución no uniforme de las células en el superficie del sustrato y la pérdida de la conformación natural de las células (por ejemplo, pérdida de palidez). Por el contrario, si el aplicador se traslada a una tasa demasiado baja con respecto a la tasa de distribución de líquido, entonces el líquido se acumula cerca de la punta del aplicador, lo que también da como resultado una distribución celular no uniforme. En consecuencia, la velocidad de traslación del aplicador y la tasa de distribución de líquido se seleccionan en combinación para garantizar que las células se depositen uniformemente, que conserven su conformación natural y que el procedimiento de depósito global se produce dentro de un tiempo de procesamiento adecuadamente corto.

(vi) Separación de filas adyacentes

El ajuste de la separación de filas (por ejemplo, controlando el desplazamiento del aplicador de muestras 100 entre la distribución de líquido en filas adyacentes) se puede usar para compensar varios fenómenos que afectan a la calidad de las muestras preparadas. En general, a medida que se incrementa la cantidad de superposición de filas adyacentes, se incrementa la uniformidad de la capa distribuida sobre el sustrato 102. Sin embargo, cuando se incrementa la cantidad de superposición, las células depositadas tardan más en secarse sobre el sustrato 102, lo que puede dar lugar a la distorsión de la conformación (por ejemplo, pérdida de palidez central y/o formación de células diana). En general, se pueden usar separaciones de filas de entre 0,20 mm y 0,60 mm (por ejemplo, entre 0,25 mm y 0,55 mm, 0,30 mm y 0,40 mm) para compensar dichos factores.

Los líquidos difieren en sus viscosidades, e incluso diferentes muestras de un tipo particular de líquido, tal como sangre, pueden tener diferentes viscosidades. El ajuste de la separación de filas puede compensar dichas variaciones entre muestras. En general, a medida que se incrementa la viscosidad de una muestra, se incrementa la separación de filas adyacentes (por ejemplo, se reduce el grado de superposición entre filas adyacentes) para evitar la formación de regiones superpuestas con concentraciones celulares que son significativamente más grandes que en regiones no superpuestas; ya que los líquidos más viscosos no fluyen tan libremente como las soluciones menos viscosas, las distribuciones no homogéneas de las células en el sustrato 102 no se dispersan tan fácilmente como en soluciones menos viscosas). Se ha observado que para muestras de sangre en general, una separación de filas de aproximadamente 0,4 mm proporciona filas que fluyen entre sí y simplemente se tocan, proporcionando una muestra altamente uniforme.

También se ha observado que la viscosidad del líquido distribuido puede cambiar durante el depósito sobre un solo sustrato, de modo que la viscosidad de las primeras filas difiere de la viscosidad de las pocas filas finales que se distribuyen. Por ejemplo, si las filas finales distribuidas tienen una viscosidad menor, fluirán juntas y se superpondrán en mayor medida que las primeras filas. Para compensar esta variación, la separación entre filas adyacentes se puede ajustar durante la distribución de líquido sobre un solo sustrato. Por ejemplo, la separación entre filas adyacentes se puede incrementar durante la distribución del líquido de modo que a pesar de las diferencias en la viscosidad, la cantidad de superposición entre filas adyacentes permanece aproximadamente igual. La separación se puede ajustar de forma lineal entre filas sucesivas. De forma alternativa, la separación se puede ajustar de forma no lineal (por ejemplo, de acuerdo con una función exponencial).

En algunos modos de realización, para controlar la separación entre filas adyacentes de líquido, el aplicador de muestras 100 puede incluir múltiples canales de flujo de líquido. La FIG. 13 es una vista en sección transversal de un aplicador de muestras 100 que incluye cuatro canales de flujo de líquido 2202, 2204, 2206 y 2208. El líquido fluye a través de cada uno de los canales y sobre la superficie del sustrato 102. Aunque se muestran cuatro canales en la FIG. 13, más en general, el aplicador de muestras 100 puede incluir cualquier número de canales (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, diez o más, 20 o más, 30 o más, 50 o más). En determinados modos de realización, el aplicador de muestras 100 puede incluir un número suficiente de canales de modo que el líquido

suficiente para cubrir un sustrato completo se pueda depositar en una sola pasada. Al depositar líquido sobre el sustrato en una sola pasada, algunos de los factores analizados anteriormente (tales como la formación de células diana y el apilamiento de células) se pueden mitigar en gran medida.

(vii) Longitud de la fila

La longitud de las filas depositadas también se puede ajustar para garantizar que las células se depositen sobre la superficie del sustrato de manera homogénea. En particular, debido a que las filas de líquido se depositan en un patrón de superposición secuencial, ajustando la longitud de la fila, se puede controlar el retardo temporal entre la distribución de filas sucesivas. Como se explica anteriormente, el retardo entre filas sucesivas influye en la medida en que una fila particular se seca antes de que se deposite una fila superpuesta.

Mantener un "borde húmedo" durante la distribución de filas de líquido sobre el sustrato puede ser un aspecto importante del procedimiento de depósito de líquido para garantizar que las muestras sean uniformes. El "borde húmedo" se refiere al borde de la fila distribuida previamente que está más cerca de la fila de líquido que se distribuye actualmente sobre la superficie del sustrato. Mantener un borde "húmedo" se refiere a ajustar las propiedades del sistema de modo que el borde de la fila distribuida previamente más cercano a la fila actual no se seca completamente antes de que se deposite la fila actual y, por lo tanto, fluye conjuntamente con la fila que se está distribuyendo actualmente de modo que las filas entran en contacto entre sí. Garantizando que la fila previa no está completamente seca, el líquido de la fila previa y de la fila actual pueden fluir juntos cuando se deposita la fila actual, dando lugar a una distribución más uniforme de las células en la superficie del sustrato cuando la muestra se seca posteriormente.

Más en general, mantener un "borde húmedo" se refiere a ajustar las propiedades del sistema de depósito de líquido para garantizar que cada fila de líquido se seca solo durante un determinado período de tiempo antes de que se distribuya una fila posterior de líquido, para garantizar que las filas distribuidas sucesivamente fluyan juntas para entrar en contacto entre sí y dejar una distribución de células en la superficie del sustrato que sea relativamente uniforme en la superficie del sustrato una vez que se completa la distribución de líquido y se seca el líquido. Debido a que mantener un "borde húmedo" es un aspecto importante para garantizar que las células depositadas conserven su conformación y se distribuyan de manera homogénea, el ajuste de la longitud de la fila se puede usar para influir directamente en la calidad de las muestras que se producen.

Típicamente, las longitudes de fila se ajustan de modo que las filas de líquido distribuido ocupen un porcentaje del área disponible en la superficie del sustrato. En algunos modos de realización, por ejemplo, la superficie del sustrato tiene conformación rectangular, y las filas de líquido distribuido se extienden a lo largo de un 60 % o más (por ejemplo, 70 % o más, 80% o más, 90 % o más, 95 % o más, 99 % o más) de la dimensión más larga de la superficie rectangular. Además, los sistemas divulgados en el presente documento se pueden configurar para ajustar la longitud de la fila durante la distribución, de modo que no todas las filas tengan la misma longitud. Por ejemplo, la longitud de la fila se puede cambiar para tener en cuenta los cambios en la composición del líquido, la temperatura y/o la humedad durante el depósito de líquido.

En determinados modos de realización, los sistemas divulgados en el presente documento se pueden configurar para distribuir filas de líquido a lo largo de diferentes direcciones en la superficie del sustrato. Por ejemplo, para acortar la longitud de la fila sobre un sustrato con una superficie rectangular, se pueden depositar filas de líquido trasladando el aplicador en una dirección paralela a la dimensión más corta de la superficie rectangular. Más en general, se pueden depositar fila de líquido trasladando el aplicador en cualquier dirección con respecto al plano de la superficie del sustrato. Por tanto, por ejemplo, para distribuir filas de líquido que tienen una longitud intermedia entre las dimensiones corta y larga de una superficie de sustrato rectangular, las filas de líquido se pueden distribuir en ángulo a ambos bordes de la superficie; el ángulo se puede seleccionar para ajustar el retardo temporal entre filas sucesivas.

Se ha descubierto a través de una cuidadosa experimentación que al trasladar el aplicador en una dirección paralela a la dimensión más corta de la superficie rectangular, determinadas longitudes de fila proporcionan condiciones particularmente ventajosas para mantener un "borde húmedo" durante el depósito de líquido, y para secar el líquido y las células depositados. En particular, se obtienen muestras de alta calidad (por ejemplo, muestras donde las células se depositan uniformemente y se conserva la morfología celular) cuando las filas distribuidas de líquido se extienden a lo largo de un 80 % o más (por ejemplo, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más) de la dimensión más corta de la superficie rectangular del sustrato.

(viii) Humedad y temperatura

Tanto la humedad relativa como la temperatura afectan a la calidad con la que las células se depositan sobre la superficie del sustrato cuando se distribuye líquido del aplicador. En general, la tasa a la que se seca el líquido distribuido se ve afectada tanto por la humedad relativa como por la temperatura. En entornos donde la humedad relativa es mayor y/o la temperatura es menor, el líquido distribuido se seca más lentamente. Por el contrario, donde la humedad relativa es menor y/o la temperatura es mayor, el líquido distribuido se seca más rápidamente. En consecuencia, el control de la humedad relativa y/o la temperatura proporciona otra técnica (o complementaria) para controlar la tasa a la que se secan las filas de líquido distribuidas en la superficie del sustrato, lo que a su vez influye en

la medida en que se aplica una distribución homogénea de células a la superficie del sustrato y la medida en que las conformaciones de las células aplicadas se conservan para el análisis.

En referencia de nuevo a la FIG. 11, en algunos modos de realización, el sistema puede incluir uno o ambos de un sensor de temperatura 2012 y un sensor de humedad 2014. Los sensores 2012 y 2014 se pueden conectar a la unidad de control 160, que está configurada para recibir mediciones de temperatura y humedad de los sensores 2012 y 2014, y para ajustar los parámetros del sistema (por ejemplo, la tasa de distribución de líquido, la velocidad de traslación del aplicador, la separación de filas adyacentes, la longitud de la fila) para mitigar los efectos de temperatura y/o humedad.

Además, en algunos modos de realización, la unidad de control 160 se puede configurar para controlar la temperatura y/o la humedad relativa del sistema global. Por ejemplo, para garantizar que se obtienen muestras de alta calidad, la temperatura a la que se distribuyen las filas de líquido se puede mantener dentro de un intervalo de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 27 °C.

Como otro ejemplo, para garantizar que se obtienen muestras de alta calidad, la humedad relativa a la que se distribuyen las filas de líquido (es decir, dentro del sistema de depósito de líquido) se puede mantener dentro de un intervalo de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 60 %.

(ix) Selección de parámetros de distribución de líquido

Como se analiza anteriormente, una variedad de diferentes parámetros de funcionamiento, incluyendo la altura del aplicador, la tasa de distribución de líquido, la velocidad de traslación relativa del aplicador, la separación de filas adyacentes, la longitud de la fila, la temperatura y la humedad, influyen en la calidad (por ejemplo, homogeneidad) de la distribución celular en la superficie del sustrato y el grado en que las células depositadas conservan su conformación natural. Los sistemas divulgados en el presente documento pueden seleccionar o determinar automáticamente combinaciones de estos parámetros para garantizar que se obtienen muestras de alta calidad.

En algunos modos de realización, los sistemas incluyen "perfiles" definidos que son específicos para determinados tipos de muestras o condiciones ambientales. Los perfiles incluyen conjuntos de parámetros predeterminados que se usan para configurar los sistemas para determinadas muestras o condiciones ambientales. Por ejemplo, los sistemas pueden incluir perfiles para diferentes niveles de humedad, y la unidad de control 160 se puede configurar para seleccionar y aplicar un perfil de configuración particular basado en una medición de humedad relativa (por ejemplo, por el sensor 2014). Como otro ejemplo, los sistemas pueden incluir perfiles para diferentes temperaturas, y la unidad de control 160 se puede configurar para seleccionar y aplicar un perfil de configuración particular basado en una medición de temperatura por el sensor 2012.

Los perfiles de configuración específicos también se pueden aplicar en base a los comentarios de un operario del sistema. Por ejemplo, el operario del sistema puede proporcionar información sobre la naturaleza del líquido que se distribuye (por ejemplo, sangre completa, una suspensión de componentes sanguíneos tales como células y/u otro líquido corporal), y la unidad de control 160 se puede configurar para aplicar un perfil de configuración predefinido para el líquido.

En algunos modos de realización, los sistemas divulgados en el presente documento se pueden configurar para ajustar automáticamente uno o más de los parámetros anteriores para mejorar la calidad de las muestras preparadas por depósito. Como se analiza anteriormente, cuando se usa una combinación inadecuada de parámetros, las células depositadas no se distribuyen homogéneamente en la superficie del sustrato. Se ha observado además que dichas células no se tiñen uniformemente. Como resultado, las mediciones de la distribución celular y/o la uniformidad de la tinción y/o la morfología celular se pueden usar para guiar el ajuste de los parámetros de funcionamiento de los sistemas.

La FIG. 14 es un diagrama de flujo 2300 que muestra una serie de etapas para ajustar uno o más parámetros de funcionamiento de los sistemas divulgados en el presente documento. En la etapa 2302, se selecciona un conjunto inicial de parámetros de funcionamiento (por ejemplo, de un archivo de configuración almacenado y/o en base a la entrada del operario del sistema). A continuación, en la etapa 2304, se depositan filas de líquido en la superficie de un sustrato de acuerdo con los parámetros de funcionamiento (por ejemplo, la altura del aplicador, la tasa de distribución de líquido, la velocidad de traslación relativa del aplicador, la separación de filas adyacentes, la longitud de la fila, la temperatura y la humedad) seleccionados en la etapa 2302. A continuación, en la etapa 2306, se procesan las filas de líquido distribuidas en la superficie del sustrato, por ejemplo, secando las filas, aplicando una o más soluciones de tinción, fijando soluciones, aclarando soluciones y/u otros tratamientos, para proporcionar una muestra preparada para examen.

En la etapa 2308, se examina la muestra preparada (típicamente con un aumento relativamente bajo) para adquirir una o más imágenes de muestra. Se puede usar cualquiera de los detectores de imágenes divulgados en el presente documento para adquirir dichas imágenes, que a continuación se analizan en la etapa 2310 (por ejemplo, por la unidad de control 160) para evaluar la homogeneidad de la distribución celular y/o la uniformidad de la tinción en la superficie del sustrato. Las métricas se pueden calcular para cuantificar la distribución o uniformidad. Por ejemplo, la desviación

estándar de la absorción de luz sobre una parte de la muestra en el sustrato (o sobre toda la muestra en el sustrato) se puede usar para cuantificar y evaluar la distribución y/o uniformidad de la muestra distribuida. Los valores relativamente mayores de la desviación estándar típicamente indican que la tinción y/o las células se distribuyen con menos uniformidad a través del sustrato.

A continuación, en la etapa 2312, uno o más de los parámetros de funcionamiento se pueden ajustar en base a las métricas calculadas para mejorar la calidad de las muestras preparadas (por ejemplo, proporcionar muestras donde las células depositadas se distribuyen más homogéneamente en la superficie del sustrato y/o se tiñen más uniformemente). Por ejemplo, la tinción no uniforme de las células depositadas se puede deber a hemólisis y/o deformación celular. Dependiendo de la extensión de la tinción no uniforme, los sistemas divulgados en el presente documento se pueden configurar para ajustar una o más de la altura del aplicador, la tasa de distribución de líquido, la velocidad de traslación relativa del aplicador, la separación de filas adyacentes, la longitud de la fila, la temperatura y/o la humedad para aliviar la hemólisis y/o la deformación celular. De manera similar, las distribuciones celulares no homogéneas se pueden deber a un flujo de líquido no uniforme durante la distribución, y los sistemas divulgados en el presente documento se pueden configurar para ajustar una o más de la altura del aplicador, la tasa de distribución de líquido, la velocidad de traslación relativa del aplicador, la separación de filas adyacentes, la longitud de la fila, la temperatura y/o la humedad para mejorar la uniformidad del flujo de líquido durante la distribución.

Si la muestra que se ha preparado es una muestra del paciente que se va a usar para análisis, entonces se realiza el análisis de la muestra. De forma alternativa, si la muestra es simplemente una muestra de prueba (por ejemplo, una muestra que se procesa para calibrar el sistema), la muestra de prueba se puede desechar opcionalmente. A continuación se obtiene un nuevo sustrato en la etapa 2314, y el procedimiento mostrado en la FIG. 14 se repite.

En algunos modos de realización, los parámetros de funcionamiento se ajustan sujetos a diversas restricciones. Por ejemplo, la humedad relativa y la temperatura de los sistemas divulgados en el presente documento se pueden ajustar dentro de determinados límites, pero ni la humedad ni la temperatura se pueden ajustar sin restricciones, debido a que el funcionamiento de otros componentes en los sistemas divulgados en el presente documento también se puede ver afectado por cambios en humedad y/o temperatura.

Otra restricción a la que se puede someter el ajuste de parámetros es el tiempo total consumido en la distribución del volumen de líquido sobre la superficie del sustrato. En general, las muestras se preparan distribuyendo un volumen controlado sobre un área controlada de la superficie del sustrato. Para lograr un alto rendimiento del sistema, el tiempo total consumido en la distribución del líquido típicamente tiene un límite superior. En consecuencia, los parámetros de funcionamiento de depósito de líquido se ajustan sujetos a la restricción de que no se exceda el límite de tiempo superior para el depósito de líquido. Por tanto, por ejemplo, si el ajuste de la tasa de distribución de líquido ocasionaría que el tiempo de distribución total exceda el límite superior, entonces la tasa de distribución de líquido se puede mantener y otros parámetros, tales como la velocidad de traslación relativa del aplicador, la separación de filas adyacentes y/o la longitud de la fila, se pueden ajustar para controlar la calidad de las muestras obtenidas.

Componentes del sistema

Volviendo de nuevo a la FIG. 1A, el manipulador 150 puede incluir una variedad de dispositivos diferentes. En general, el manipulador 150 funciona para trasladar el aplicador de muestras 100 en tres direcciones de coordenadas ortogonales diferentes. Los manipuladores adecuados incluyen, por ejemplo, actuadores activados por motores paso a paso, levas y actuadores piezoeléctricos.

El detector 106 puede incluir una variedad de dispositivos para capturar imágenes del aplicador de muestras 100. En algunos modos de realización, por ejemplo, el detector 106 puede incluir un detector de matriz CCD. En determinados modos de realización, el detector 106 puede incluir un detector de matriz basado en CMOS. El detector 106 también puede incluir otros elementos de imagen óptica tales como filtros, lentes, divisores de haz y elementos ópticos dispersivos.

La plataforma 152 está configurada para soportar el sustrato 102 durante la distribución del líquido 104. En determinados modos de realización, la plataforma 152 está formada de un material rígido tal como un metal (por ejemplo, aluminio y/o acero inoxidable) y/o un material plástico (por ejemplo, un material a base de Teflon®). La plataforma 152 también puede incluir actuadores para trasladar el sustrato 102 (y parte o la totalidad de la plataforma 152) en una o más direcciones de coordenadas, por ejemplo, en el plano x-y, mientras que el aplicador 100 permanece estacionario para distribuir el líquido de la muestra. En algunos modos de realización, la plataforma 152 puede incluir actuadores para cambiar una orientación del sustrato 102 y parte o la totalidad de la plataforma 152. La unidad de control 160 está conectada a la plataforma 152 y puede emitir señales de control a la plataforma 152 para iniciar la traslación y/o reorientación del sustrato 102.

En algunos modos de realización, el sistema 50 puede incluir una fuente de luz 170 para dirigir la luz incidente sobre el aplicador de muestras 100. La fuente de luz 170 se puede conectar eléctricamente a la unidad de control 160 como se muestra en la FIG. 1A. La fuente de luz 170 puede incluir, por ejemplo, una o más fuentes incandescentes, fluorescentes, basadas en diodos y/o láser. La luz incidente producida por la fuente de luz 170 puede incluir longitudes

de onda en una o más de las regiones ultravioleta, visible e infrarroja del espectro electromagnético.

La unidad de control 160 incluye un procesador electrónico 162, que se puede configurar para controlar diversos componentes en el sistema 50 y realizar cualquiera de las etapas del procedimiento divulgadas en el presente documento. Por ejemplo, el procesador electrónico 162 se puede configurar para dirigir el detector 106 para capturar una o más imágenes del aplicador de muestras 100 como se describe en el presente documento. Además, el procesador electrónico 162 se puede configurar para dirigir la fuente de luz 170 para emitir luz incidente que ilumina el aplicador de muestras 100 durante la captura de imágenes.

El procesador electrónico 162 se puede configurar además para transmitir señales de control al manipulador 150 para provocar que el manipulador 150 traslade el aplicador de muestras 100 y/o plataforma 152 como se divulga en el presente documento. En particular, las señales de control del procesador electrónico 162 pueden dirigir el manipulador 150 para trasladar el aplicador de muestras 100 a lo largo de las direcciones de las coordenadas x y/o y del manipulador 150 a una nueva localización con respecto al sustrato 102. De forma alternativa o además, el procesador electrónico 162 puede transmitir señales de control a la plataforma 152 para trasladar el sustrato 102 en la dirección x y/o y, mientras que el aplicador 100 permanece estacionario. El procesador electrónico 162 también puede transmitir señales de control que dirigen al manipulador 150 para trasladar el aplicador de muestras 100 a lo largo de la dirección de la coordenada z del manipulador 150 a una nueva altura por encima del sustrato 102, y puede transmitir señales de control a la plataforma 152 para trasladar el sustrato 102 (por ejemplo, mientras el aplicador de muestras 100 permanece estacionario) para cambiar la altura del aplicador 100 por encima del sustrato 102.

En algunos modos de realización, la unidad de control 160 incluye una unidad de almacenamiento 164. La unidad de almacenamiento 164 puede incluir, por ejemplo, uno o más de una variedad de dispositivos diferentes para almacenar información de forma óptica, eléctrica y/o magnética. Los dispositivos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, dispositivos de almacenamiento magnético tales como discos duros y disquetes, dispositivos de almacenamiento óptico tales como discos CD y/o DVD y sus medios de almacenamiento, y dispositivos electrónicos tales como dispositivos de memoria flash y discos de estado sólido. La unidad de almacenamiento 164 se puede configurar para almacenar cualquiera de los valores o cantidades divulgados en el presente documento, incluidas las localizaciones del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102, configuraciones de control determinadas para el aplicador de muestras que garantizan que el aplicador se mantenga a una altura constante por encima de la superficie superior 102a del sustrato 102, las alturas medidas del aplicador de muestras por encima del sustrato 102, las separaciones μh y/o μt entre las imágenes, los grosores medidos del sustrato 102 y el programa informático que contiene instrucciones que, cuando se ejecutan, provocan que el procesador 162 realice una cualquiera o más de las funciones o etapas divulgadas en el presente documento.

Sistemas de preparación de muestras automatizados

Los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento se pueden usar con una variedad de diferentes sistemas de preparación de muestras automatizados. Se divulgan sistemas ejemplares, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE. UU. n.º de serie 13/293,050, presentada el 9 de noviembre de 2011, y ahora publicada como publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2012/0149050.

La FIG. 10 muestra un diagrama esquemático de un modo de realización de un sistema de preparación de muestras automatizado 1000. El sistema 1000 incluye múltiples subsistemas para almacenar sustratos, depositar muestras sobre sustratos, inspeccionar muestras preparadas sobre sustratos y almacenar muestras preparadas.

El subsistema de almacenamiento de sustratos 1010 está configurado para almacenar sustratos antes del depósito de muestras sobre los mismos. Los sustratos pueden incluir, por ejemplo, portaobjetos, cubreobjetos y sustratos planos ópticamente transparentes similares. Los sustratos se pueden formar a partir de una variedad de diferentes materiales amorfos o cristalinos que incluyen varios tipos de vidrios. El subsistema 1010 puede incluir un manipulador que selecciona sustratos individuales de un recipiente de almacenamiento y transfiere los sustratos seleccionados al subsistema de depósito de muestras 1020.

El subsistema de depósito de muestras 1020 deposita una cantidad seleccionada de una muestra de interés, tal como una muestra de sangre, sobre un sustrato. El subsistema 1020 incluye, en general, una variedad de componentes de transferencia de líquido (por ejemplo, bombas, tubos de líquido, válvulas) configurados para depositar la muestra. Los componentes de transferencia de líquido también se pueden configurar para exponer el sustrato a soluciones de diversos tipos, incluyendo soluciones de lavado, una o más tinciones que se unen a la muestra, soluciones fijadoras y soluciones tampón. El subsistema 1020 también puede presentar componentes de retirada de líquido (por ejemplo, un subsistema de vacío) y un aparato de secado para garantizar que la muestra se fije al sustrato. Un manipulador de sustrato puede transferir el sustrato que soporta la muestra al subsistema de imagen 1030.

Como se analiza anteriormente, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento permiten la determinación del grosor del sustrato 102 en base a imágenes del aplicador de muestras que se reflejan desde la superficie inferior 102b del sustrato. Esta información del grosor se puede usar por el subsistema de depósito de muestras 1020. Por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. n.º de serie 13/293.050, la

información del grosor del sustrato se puede usar para determinar cómo orientar el sustrato en una posición de procesamiento de muestras y el grado de agitación que se produce durante el procedimiento de depósito.

El subsistema de inspección 1030 incluye diversos componentes para obtener imágenes de muestras sobre sustratos y para analizar las imágenes para determinar información sobre las muestras. Por ejemplo, el subsistema de inspección 1030 puede incluir una o más fuentes de luz (por ejemplo, diodos emisores de luz, diodos láser y/o láseres) para dirigir la luz incidente a una muestra. El subsistema de imágenes 1030 también puede incluir un aparato óptico (por ejemplo, un objetivo de microscopio) para capturar la luz transmitida y/o reflejada de una muestra. Un detector (por ejemplo, un detector CCD) acoplado al aparato óptico se puede configurar para capturar imágenes de la muestra. La información derivada del análisis de las imágenes de la muestra se puede almacenar en una variedad de medios de almacenamiento ópticos y/o electrónicos para su posterior recuperación y/o análisis adicional.

Después de la inspección, un manipulador de sustrato puede transferir el sustrato al subsistema de almacenamiento 1040. El subsistema de almacenamiento 1040 puede etiquetar sustratos individuales, por ejemplo, con información relacionada con la fuente de la muestra aplicada al sustrato, el momento del análisis y/o cualquier irregularidad identificada durante el análisis. El subsistema de almacenamiento también puede almacenar sustratos procesados en bastidores de múltiples sustratos, que se pueden retirar del sistema 1000 a medida que se llenan con sustratos.

Como se muestra en la FIG. 10, cada uno de los diversos subsistemas del sistema 1000 puede estar vinculado a un procesador electrónico común 1050 (que puede ser el mismo que el procesador electrónico 162, o un procesador electrónico diferente). El procesador 1050 se puede configurar para controlar el funcionamiento de cada uno de los subsistemas del sistema 1000 de manera automatizada, con una entrada relativamente pequeña (o nula) por un operario del sistema. Los resultados del análisis de muestras se pueden visualizar en la pantalla del sistema 1060 para un operario supervisor. La interfaz 1070 permite al operario emitir comandos al sistema 1000 y revisar manualmente los resultados del análisis automatizado.

Implementación de equipo informático y programa informático

Las etapas del procedimiento y procedimientos descritos en el presente documento se pueden implementar en equipos físicos o en programas informáticos, o en una combinación de ambos. En particular, un procesador electrónico (por ejemplo, el procesador electrónico 162) puede incluir instrucciones de un programa informático y/o equipo físico para realizar cualquiera de los procedimientos analizados anteriormente. Los procedimientos se pueden implementar en programas informáticos usando técnicas de programación estándar que siguen las etapas y las figuras del procedimiento divulgadas en el presente documento, y almacenar en una variedad de medios no transitorios tales como discos magnéticos, medios de almacenamiento óptico tales como discos compactos y DVD, dispositivos de memoria de estado sólido tales como memoria flash y medios de almacenamiento mecánico tales como discos duros. El código del programa se aplica a los datos de entrada para realizar las funciones descritas en el presente documento. La información de salida se aplica a uno o más dispositivos de salida, tal como una impresora, un dispositivo de visualización o una página web en un monitor de un ordenador con acceso a un sitio web, por ejemplo, para monitorización remota.

Cada programa se implementa preferentemente en un lenguaje de programación orientado a objetos o procedimental de alto nivel para comunicarse con un procesador. Sin embargo, los programas se pueden implementar en lenguaje ensamblador o de máquina, si se desea. En cualquier caso, el lenguaje puede ser un lenguaje compilado o interpretado. Cada programa informático se puede almacenar en un medio de almacenamiento o dispositivo (por ejemplo, una memoria electrónica) legible por el procesador, para configurar y hacer funcionar el procesador para realizar los procedimientos descritos en el presente documento.

OTROS MODOS DE REALIZACIÓN

Se han descrito varios modos de realización. No obstante, se entenderá que se pueden hacer diversas modificaciones sin apartarse de la divulgación. En consecuencia, otros modos de realización están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para distribuir una muestra de líquido (104) sobre un sustrato (102), comprendiendo el procedimiento:

obtener una imagen de un aplicador de muestras (100) cerca del sustrato (102), en el que la imagen comprende una primera imagen (302) del aplicador de muestras (100) y una segunda imagen (304) del aplicador de muestras (100);

determinar una altura (h) del aplicador de muestras (100) con respecto a un plano de superficie del sustrato (102) en base a una distancia entre partes comunes de la primera y segunda imágenes (302, 304); y

distribuir la muestra de líquido (104) sobre el sustrato (102) usando el aplicador de muestras (100), en el que la distribución comprende:

trasladar el aplicador de muestras (100), trasladar el sustrato (102) o trasladar tanto el aplicador de muestras (100) como el sustrato (100) para efectuar una traslación relativa entre el aplicador de muestras (100) y el sustrato (102); y

mantener el aplicador de muestras (100) dentro de 2 micrómetros de una altura objetivo con respecto al plano de superficie del sustrato (102) durante el traslado.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la primera imagen (302) es una imagen directa del aplicador de muestras (100), y en el que la segunda imagen (304) es una imagen del aplicador de muestras (100) reflejada desde una superficie del sustrato (102).

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la altura objetivo está entre 9 micrómetros y 15 micrómetros.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de líquido (104) comprende sangre.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende además ajustar un parámetro de funcionamiento de un sistema distribuidor de líquido que comprende el aplicador de muestras (100) basado en al menos una de una distribución de los glóbulos sanguíneos en el sustrato (102) y una uniformidad de tinción de los glóbulos sanguíneos en el sustrato (102),

en el que la muestra de líquido (104) se distribuye sobre el sustrato (102) en una pluralidad de filas sucesivas, y en el que el parámetro de funcionamiento comprende al menos uno de un espacio entre filas adyacentes de líquido, y una longitud de las filas de líquido.

6. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende además ajustar un parámetro de funcionamiento de un sistema distribuidor de líquido que comprende el aplicador de muestras (100) basado en al menos una de una distribución de los glóbulos sanguíneos en el sustrato (102) y una uniformidad de tinción de los glóbulos sanguíneos en el sustrato,

en el que el parámetro de funcionamiento comprende al menos una de una temperatura de la muestra de líquido (104), y una humedad relativa dentro del sistema distribuidor de líquido.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además distribuir la muestra de líquido desde el aplicador de muestras (100) a una tasa de entre 0,035 µl/s y 0,075 µl/s.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además distribuir la muestra de líquido (104) sobre el sustrato (102) en una pluralidad de filas sucesivas, en el que un espacio entre filas adyacentes está entre 0,20 mm y 0,60 mm.

9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además, antes de distribuir la muestra de líquido (104) sobre el sustrato (102):

obtener información sobre la composición de la muestra;

obtener un conjunto de parámetros de funcionamiento predefinidos basados en la información; y

aplicar los parámetros de funcionamiento predefinidos para configurar un sistema distribuidor de líquido que comprende el aplicador de muestras (100), en el que el conjunto de parámetros de funcionamiento predefinidos comprende al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en la altura objetivo del aplicador de muestras (100), una tasa a la que se distribuye la muestra de líquido (104) desde el aplicador de muestras (100), una velocidad de traslación relativa entre el aplicador de muestras (100) y el sustrato (102), un espacio entre filas adyacentes de líquido distribuido por el aplicador de muestras (100) en el sustrato (102), una longitud de filas de líquido distribuido por

el aplicador de muestras (100) en el sustrato (102), una temperatura de la muestra de líquido y una humedad relativa dentro del sistema distribuidor de líquido.

10. Un sistema para distribuir una muestra de líquido (104) sobre un sustrato (102), comprendiendo el sistema:

un aplicador de muestras (100);

un detector (106) configurado para obtener imágenes del aplicador de muestras (100); y

un procesador electrónico (160), en el que el procesador electrónico (160) está configurado para:

obtener una imagen del aplicador de muestras (100) cerca del sustrato (102), en el que la imagen comprende una primera imagen (302) del aplicador de muestras (100) y una segunda imagen (304) del aplicador de muestras (100);

determinar una altura (h) del aplicador de muestras (100) con respecto a un plano de superficie del sustrato (102) en base a una distancia entre partes comunes de la primera y segunda imágenes (302, 304); y

distribuir la muestra de líquido (104) sobre el sustrato (102) usando el aplicador de muestras (100), en el que la distribución comprende:

trasladar el aplicador de muestras (100), trasladar el sustrato (102) o trasladar tanto el aplicador de muestras (100) como el sustrato (102) para efectuar una traslación relativa entre el aplicador de muestras (100) y el sustrato (102); y

mantener el aplicador de muestras (100) dentro de 2 micrómetros de una altura objetivo con respecto al plano de superficie del sustrato (102) durante el traslado.

11. El sistema de la reivindicación 10, en el que el aplicador de muestras (100) tiene un diámetro externo, y en el que una proporción del diámetro externo con respecto al diámetro interno es de 1,5 o menos.

12. El sistema de la reivindicación 10, en el que el aplicador de muestras (100) comprende un miembro tubular hueco flexible y un recubrimiento rígido que rodea el miembro tubular.

13. El sistema de la reivindicación 10, en el que el aplicador de muestras (100) comprende un canal de transporte de líquido interno con una conformación en sección transversal no circular, en el que la conformación en sección transversal del canal de transporte de líquido es ovalada.

14. El sistema de la reivindicación 10, en el que el aplicador de muestras (100) comprende una pluralidad de canales de transporte de líquido internos situados en una matriz lineal.

15. El sistema de la reivindicación 10, en el que la altura objetivo está entre 9 micrómetros y 15 micrómetros,

en el que el procesador electrónico (160) está configurado para ajustar un parámetro de funcionamiento del sistema distribuidor de líquido basado en al menos una de una distribución de los glóbulos sanguíneos en el sustrato (102) y una uniformidad de tinción de los glóbulos sanguíneos en el sustrato, en el que el parámetro de funcionamiento comprende al menos una de una tasa a la que se distribuye la muestra de líquido desde el aplicador de muestras (100), y una velocidad de traslación relativa entre el aplicador de muestras (100) y el sustrato (102).

16. El sistema de la reivindicación 10, en el que la altura objetivo está entre 9 micrómetros y 15 micrómetros, en el que el procesador electrónico (160) está configurado para ajustar un parámetro de funcionamiento del sistema distribuidor de líquido basado en al menos una de una distribución de los glóbulos sanguíneos en el sustrato y una uniformidad de tinción de los glóbulos sanguíneos en el sustrato (102),

en el que el procesador electrónico (160) está configurado para distribuir la muestra de líquido sobre el sustrato (102) en una pluralidad de filas sucesivas, y en el que el parámetro de funcionamiento comprende al menos uno de un espacio entre filas adyacentes de líquido, y una longitud de las filas de líquido.

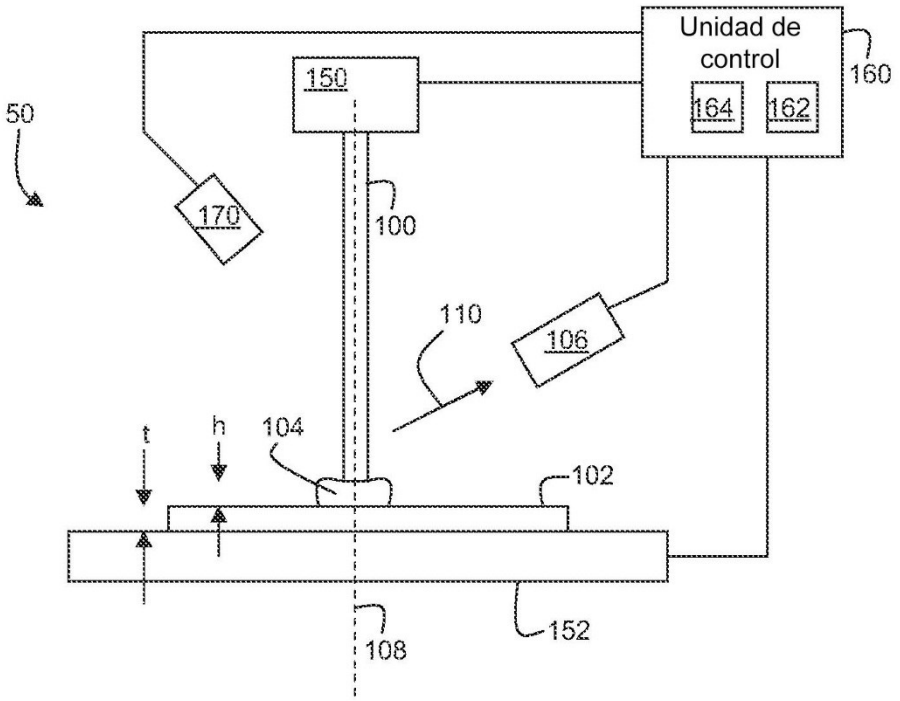
Unidad de control
160
150
164
162
50
170
100
110
106
t
h
104
102
108
152

FIG. 1A

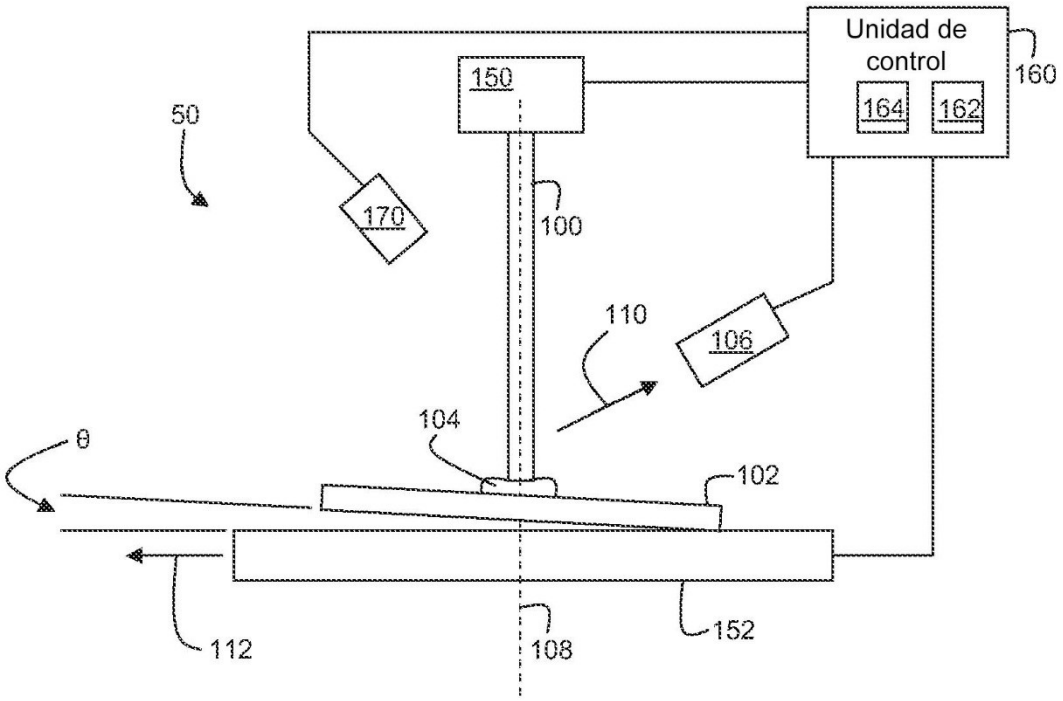
Unidad de control
160
150
164
162
50
170
100
110
106
104
θ
102
112
108
152

FIG. 1B

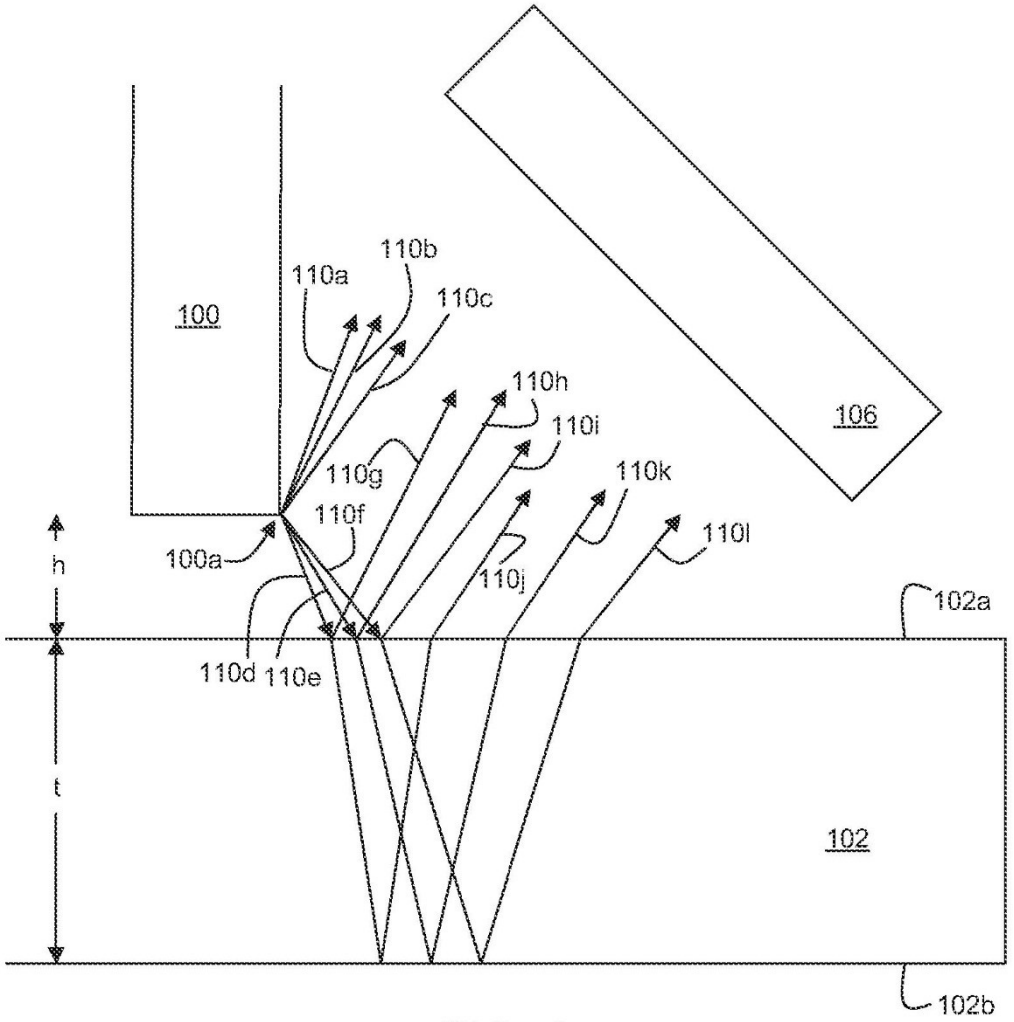
100
106
110a
110b
110c
110f
110g
110h
110i
110j
110k
110l
100a
h
t
110d
110e
102a
102
102b

FIG. 2

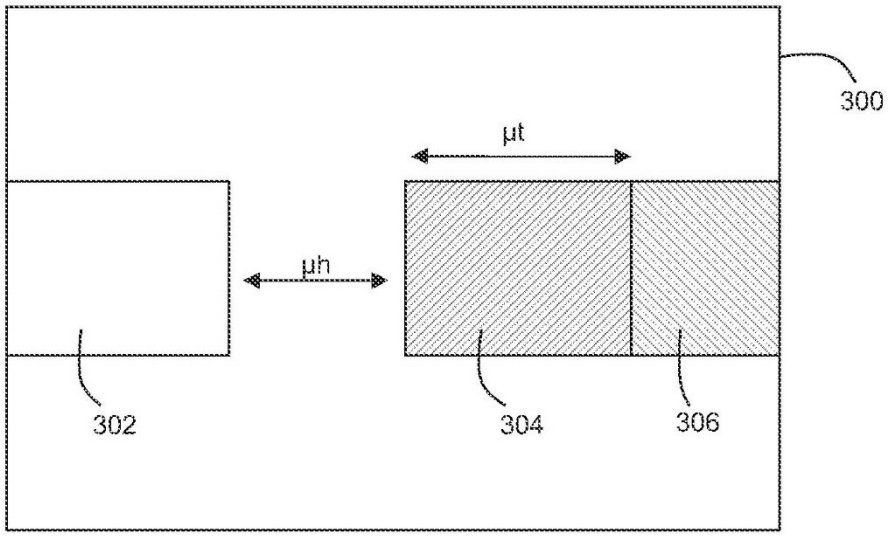
300
μt
μh
302
304
306

FIG. 3

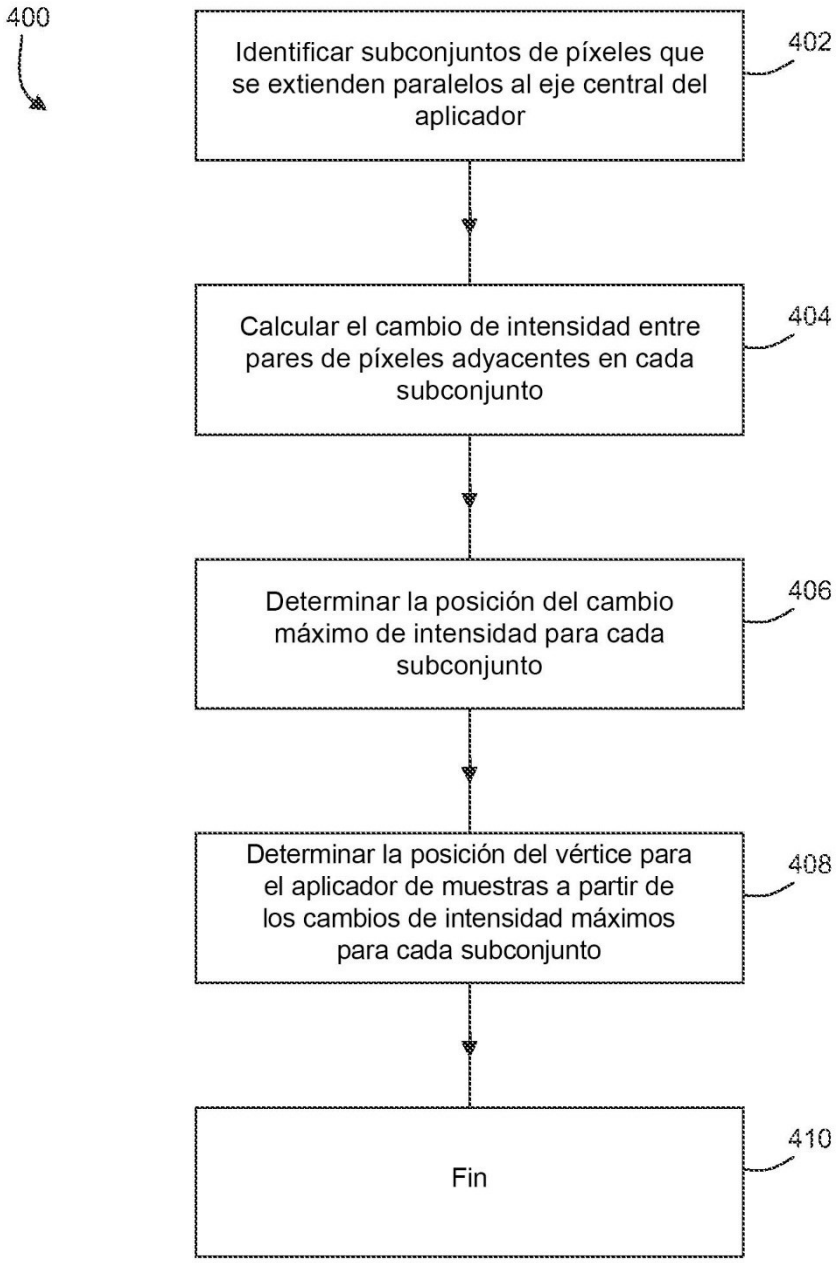
400
Identificar subconjuntos de píxeles que se extienden paralelos al eje central del aplicador
402
Calcular el cambio de intensidad entre pares de píxeles adyacentes en cada subconjunto
404
Determinar la posición del cambio máximo de intensidad para cada subconjunto
406
Determinar la posición del vértice para el aplicador de muestras a partir de los cambios de intensidad máximos para cada subconjunto
408
Fin
410

FIG. 4

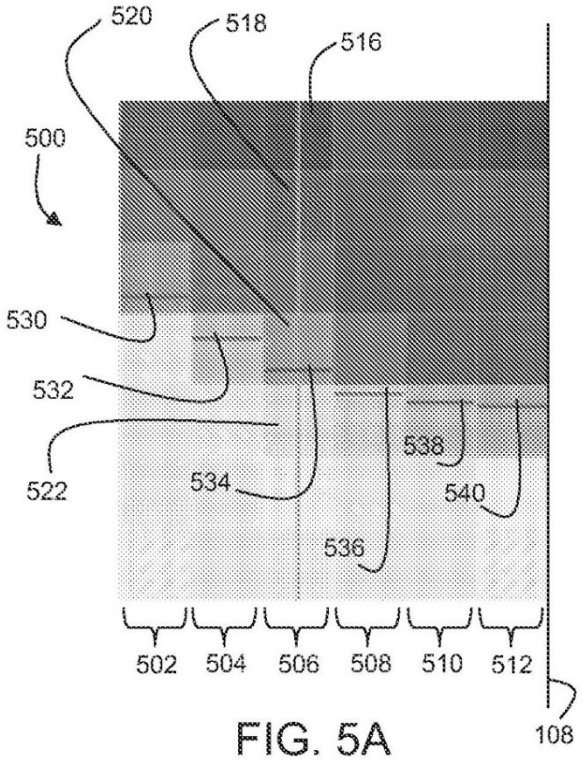

FIG. 5A

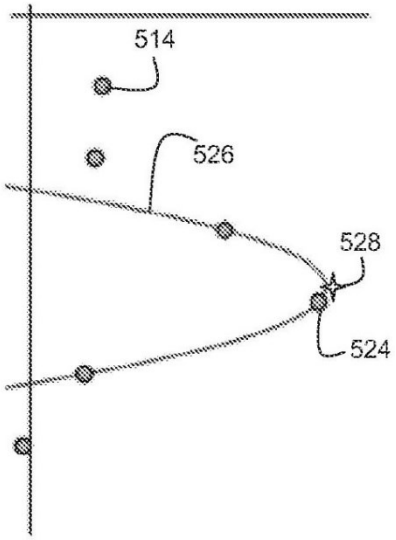

FIG. 5B

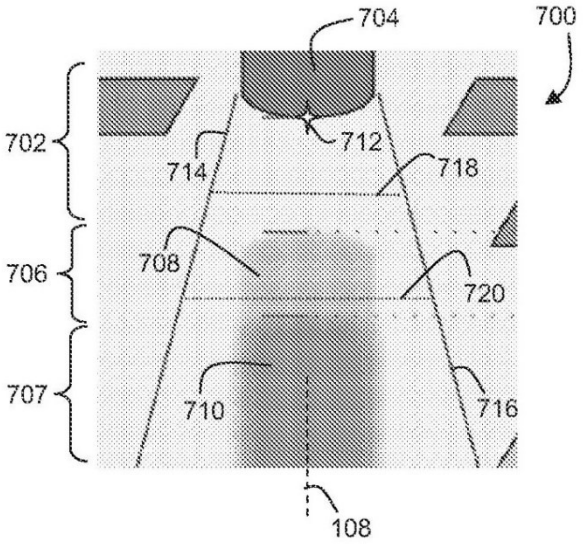

FIG. 7A

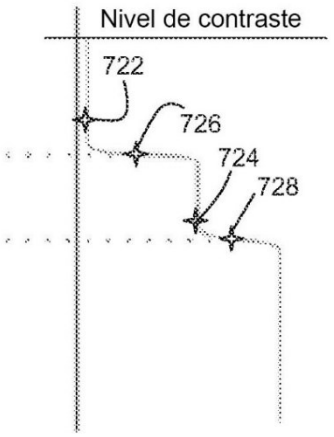

FIG. 7B

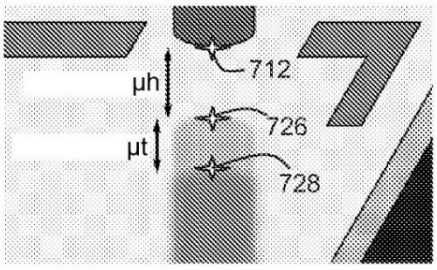

FIG. 7C

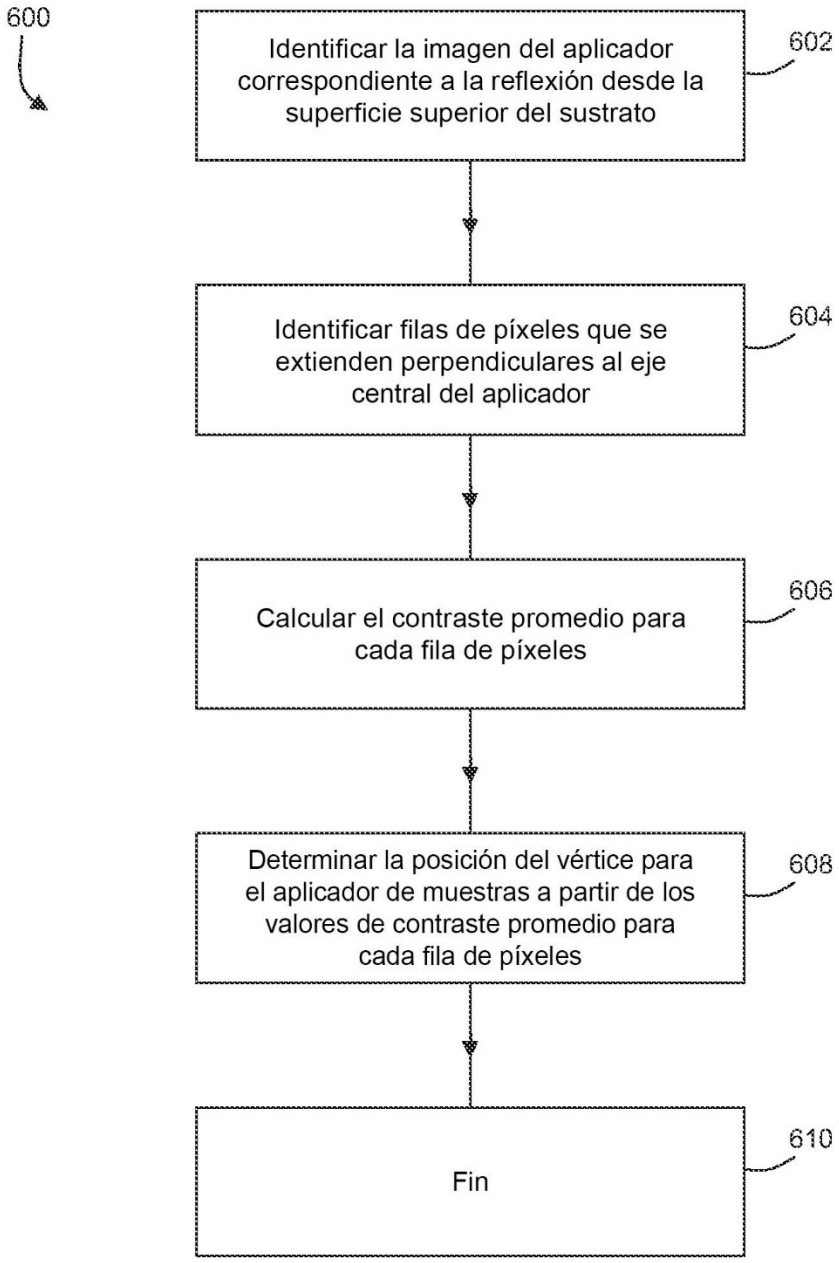
600
Identificar la imagen del aplicador correspondiente a la reflexión desde la superficie superior del sustrato
602
Identificar filas de píxeles que se extienden perpendiculares al eje central del aplicador
604
Calcular el contraste promedio para cada fila de píxeles
606
Determinar la posición del vértice para el aplicador de muestras a partir de los valores de contraste promedio para cada fila de píxeles
608
Fin
610

FIG. 6

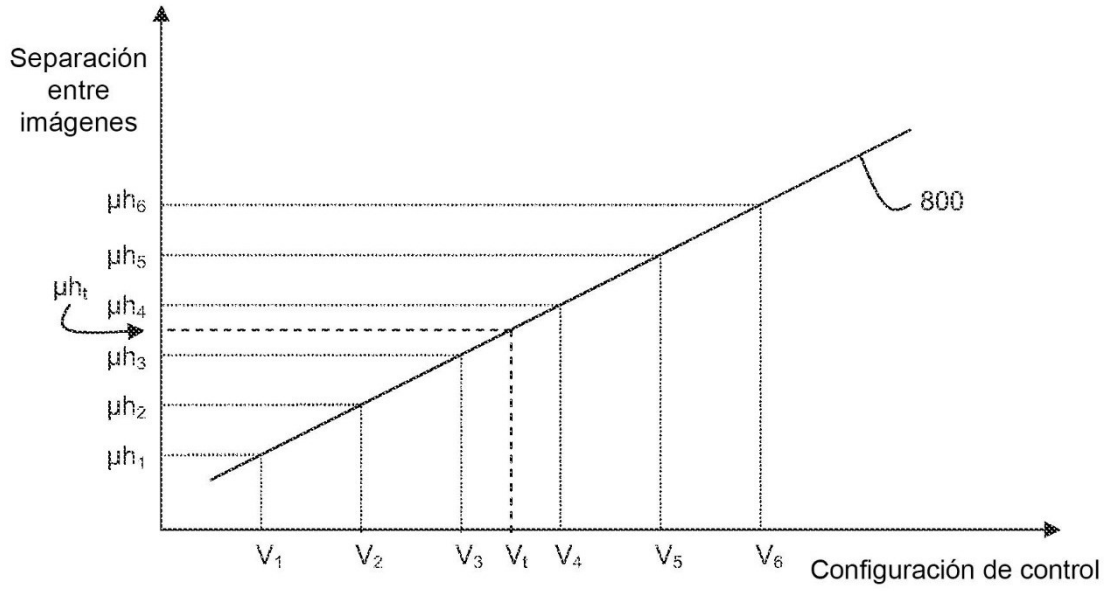
Separación entre imágenes
μh6
μh5
μht
μh4
μh3
μh2
μh1
800
V1
V2
V3
Vt
V4
V5
V6
Configuración de control

FIG. 8

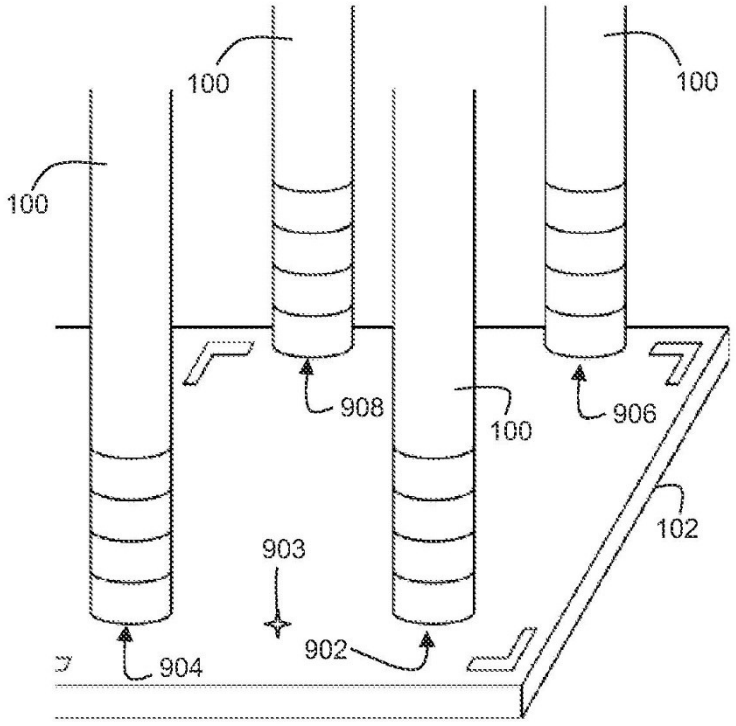
100
100
100
908
100
906
102
903
902
904

FIG. 9

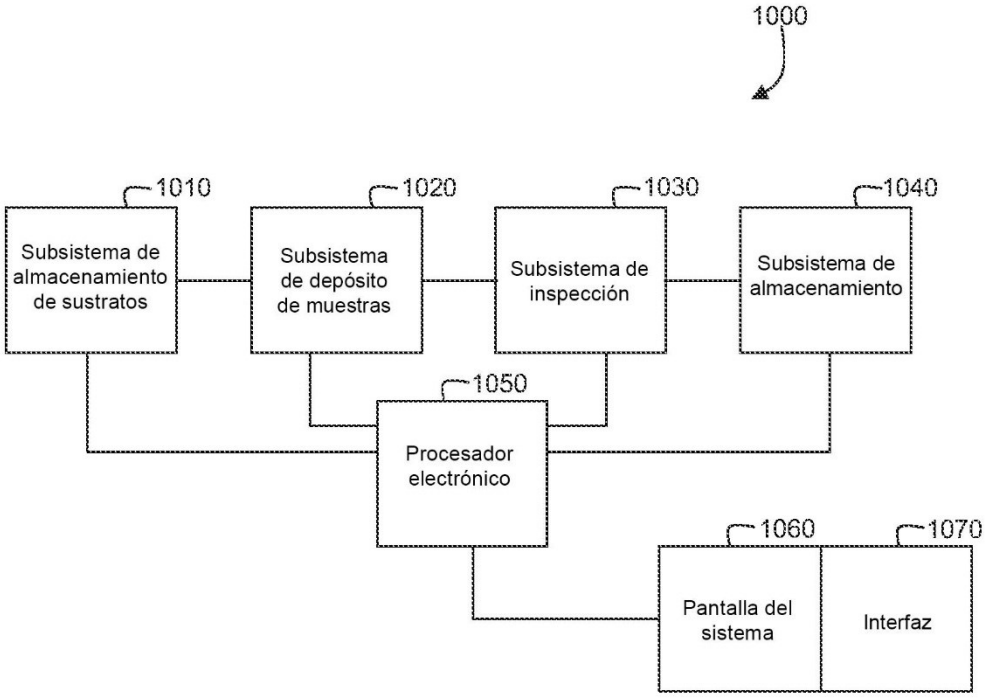
1000
1010
Subsistema de almacenamiento de sustratos
1020
Subsistema de depósito de muestras
1030
Subsistema de inspección
1040
Subsistema de almacenamiento
1050
Procesador electrónico
1060
Pantalla del sistema
1070
Interfaz

FIG. 10

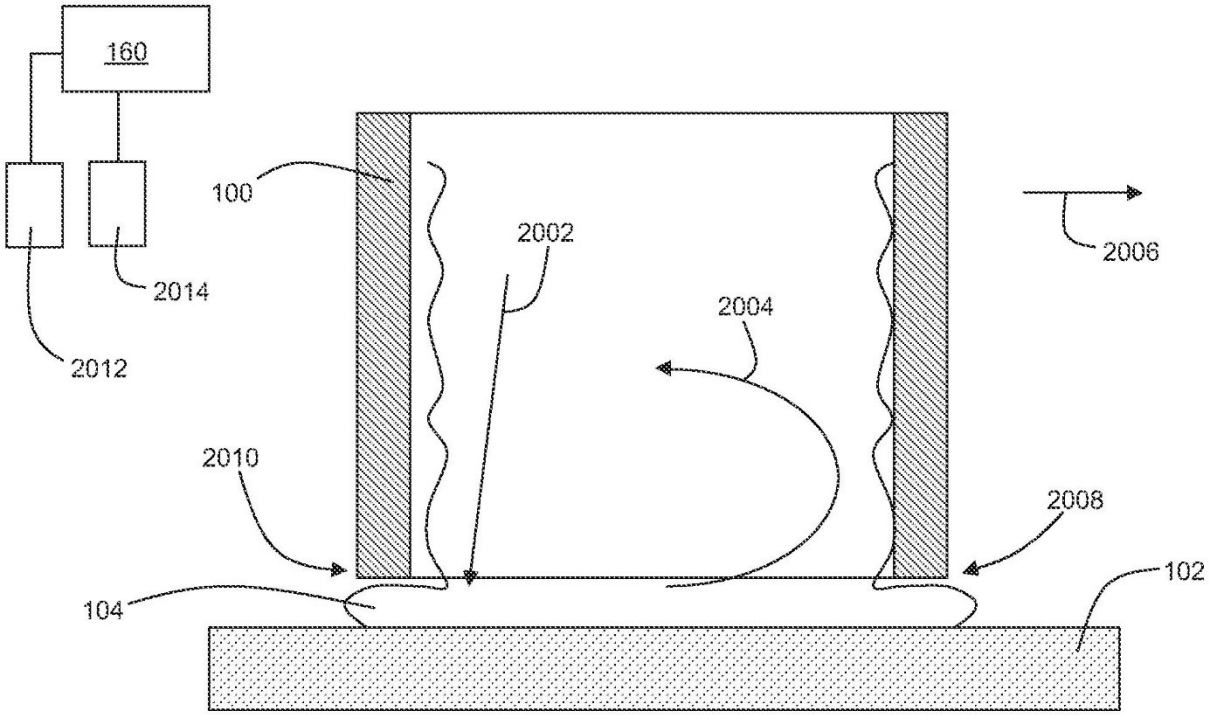
160
100
2002
2004
2006
2014
2012
2010
2008
102
104

FIG. 11

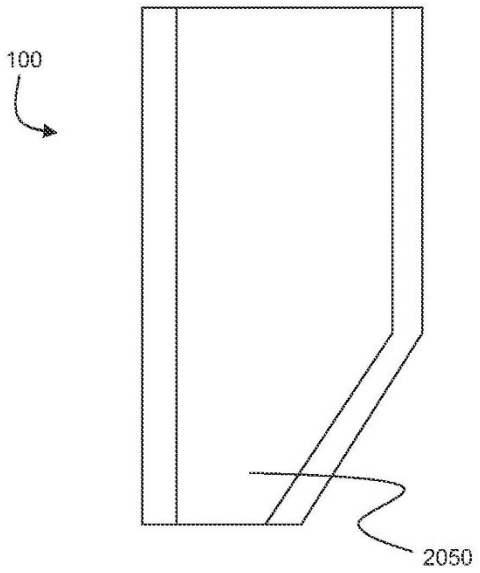

FIG. 12A

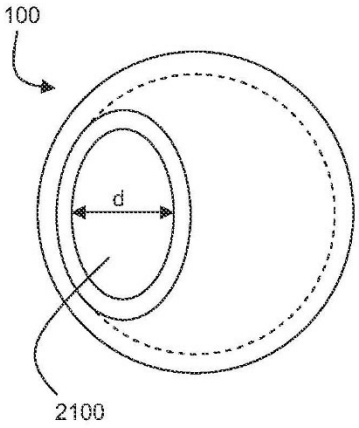

FIG. 12B

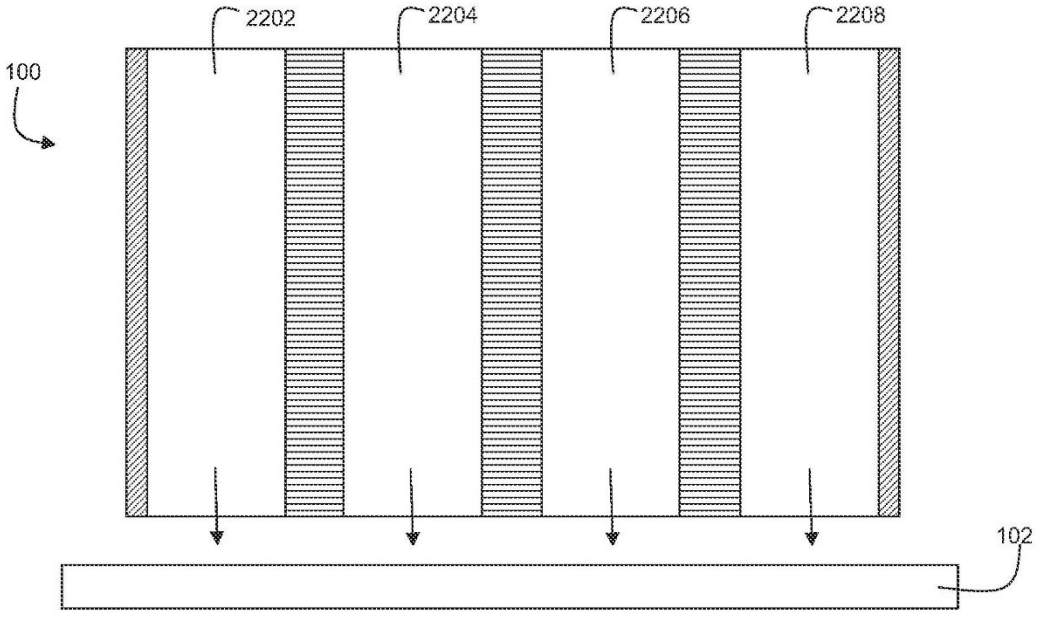

FIG. 13

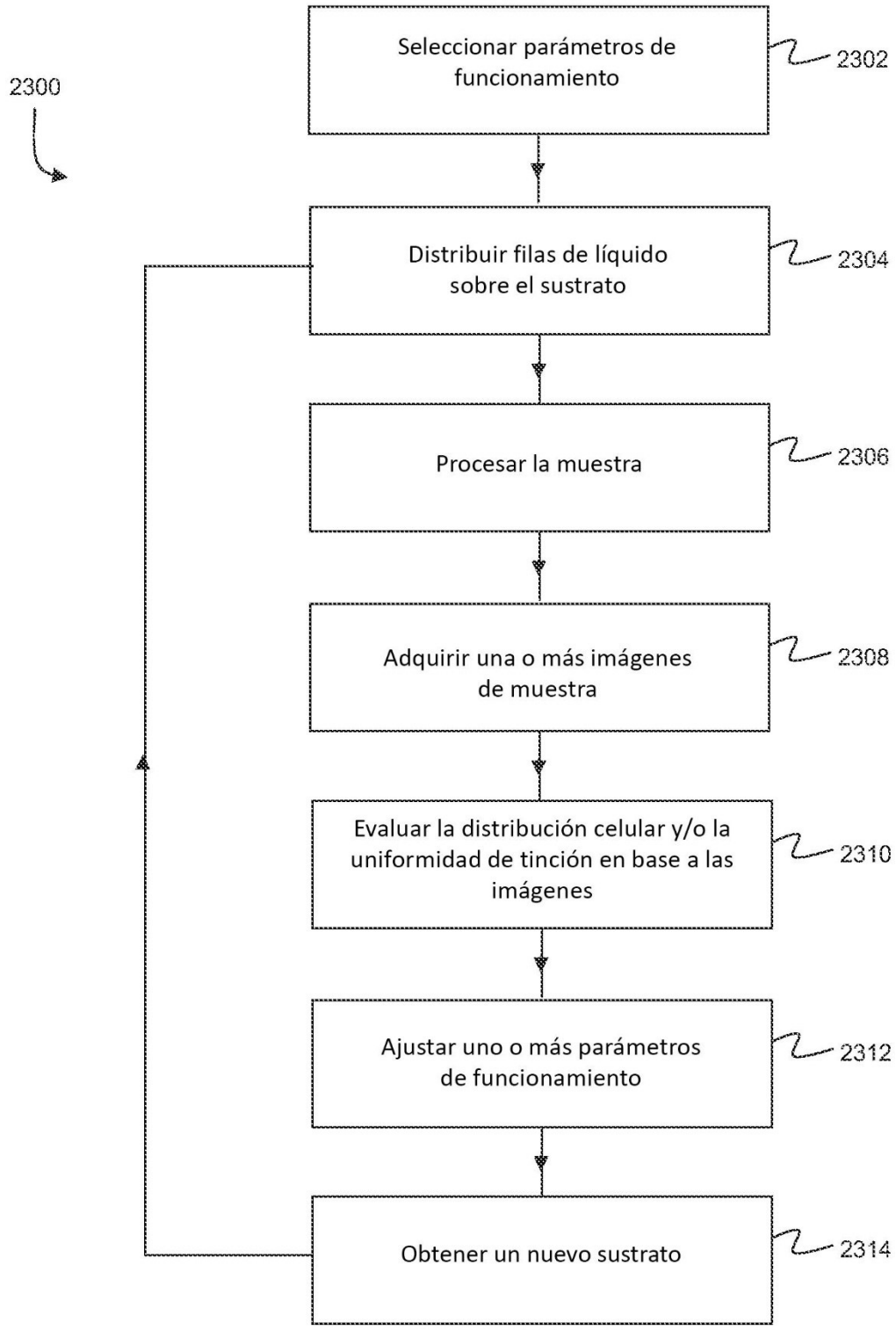
2300
Seleccionar parámetros de funcionamiento
2302
Distribuir filas de líquido sobre el sustrato
2304
Procesar la muestra
2306
Adquirir una o más imágenes de muestra
2308
Evaluar la distribución celular y/o la uniformidad de tinción en base a las imágenes
2310
Ajustar uno o más parámetros de funcionamiento
2312
Obtener un nuevo sustrato
2314

FIG. 14