

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 440**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2014.01)

G02B 21/04 (2006.01)

G02B 17/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2013 E 17160708 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2024 EP 3206010**

54 Título: **Citómetro de flujo**

30 Prioridad:

30.05.2012 US 201261653328 P

30.05.2012 US 201261653245 P

18.10.2012 US 201261715819 P

19.10.2012 US 201261715836 P

29.04.2013 US 201361816819 P

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

14.11.2024

73 Titular/es:

IRIS INTERNATIONAL, INC. (100.0%)

9172 Eton Avenue

Chatsworth, CA 91311, US

72 Inventor/es:

CHEN, YONG QIN

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 987 440 T3

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

DESCRIPCIÓN

Citómetro de flujo

5 **Campo técnico**

Las presentes divulgaciones se refieren en general al campo técnico de la citometría de flujo y, más particularmente, a la estructura y operación de un citómetro de flujo mejorado junto con diversos subconjuntos individuales incluidos en el mismo.

10

Antecedentes de la técnica

La citometría de flujo es una técnica biofísica empleada en el recuento de células, clasificación, detección de biomarcadores e ingeniería de proteínas. En citometría de flujo, las células suspendidas en una corriente de líquido pasan a través de un aparato de detección electrónico. La citometría de flujo permite el análisis multiparamétrico simultáneo de características físicas y/o químicas de hasta miles de células por segundo.

15

La citometría de flujo tiene diversas aplicaciones, incluso en los campos de la biología molecular, patología, inmunología, biología vegetal y biología marina. La citometría de flujo también tiene una amplia aplicación en medicina (especialmente en trasplante, hematología, inmunología tumoral y quimioterapia, diagnóstico prenatal, genética y clasificación de espermatozoides para la preselección de sexo).

20

En biología marina, las propiedades autofluorescentes del plancton fotosintético pueden explotarse mediante citometría de flujo para caracterizar la abundancia y la composición de la comunidad. En ingeniería de proteínas, la citometría de flujo se usa junto con la visualización de levaduras y la visualización bacteriana para identificar variantes de proteínas mostradas en la superficie celular con las propiedades deseadas.

25

Una variación común de la citometría de flujo es clasificar físicamente las partículas basándose en sus propiedades, purificando así una población de interés.

30

Un sistema de citómetro de flujo completo incluye los siguientes componentes principales.

1. Una celda de flujo a través de la cual una corriente de líquido, generalmente llamado flujo, líquido o fluido envolvente, transporta y alinea hidrodinámicamente células o partículas para que pasen en fila única a través de la celda de flujo.

35

2. Un sistema de subsistema de medición acoplado a la celda de flujo que detecta células o partículas que pasan a través de la celda de flujo y normalmente es:

- a. un subsistema de medición de impedancia o conductividad; o
- b. un subsistema de iluminación óptica junto con un subsistema de detección óptica.

40

3. Un subsistema de conversión para convertir la señal de salida del subsistema de medición en datos procesables por ordenador.

4. Un ordenador para analizar los datos producidos por el subsistema de conversión.

45

Los subsistemas de iluminación óptica proporcionan un haz de luz colimado y luego enfocado, generalmente luz láser de una sola longitud de onda, que incide sobre la corriente de líquido enfocada hidrodinámicamente que pasa a través de la celda de flujo. En consecuencia, el sistema de citómetro de flujo puede tener una o más fuentes de luz que pueden incluir:

50

- 1. una o más lámparas, p. ej., mercurio o xenón;
- 2. uno o más láseres refrigerados por agua de alta potencia, p. ej., láser de argón, criptón o de colorante;
- 3. uno o más láseres refrigerados por aire de baja potencia, p. ej., argón (488 nm), HeNe (rojo-633 nm), HeNe (verde) y HeCd (UV); y/o
- 4. uno o más láseres de diodo (azul, verde, rojo y violeta).

55

El subsistema de detección óptica incluye uno o más detectores dirigidos donde la corriente de líquido enfocada pasa a través del haz de luz. Tales detectores pueden incluir:

- 1. detectores en línea con el haz de luz (dispersión frontal o FSC);
- 2. detectores perpendiculares a este (dispersión lateral o SSC); y
- 3. detectores de fluorescencia.

60

Cada partícula suspendida que pasa a través del haz dispersa la luz, y el material fluorescente presente en la partícula o unido a la partícula excitada por la luz incidente emite luz a una longitud de onda más larga que la de la luz incidente. Detectar y analizar cambios de brillo en una combinación de luz dispersada y fluorescente en cada detector (uno para

65

cada pico de emisión fluorescente) permite derivar diversos tipos de información sobre la estructura física y química de cada partícula individual. FSC se correlaciona con el volumen celular. Debido a que la luz se dispersa fuera de los componentes internos dentro de una célula, SSC depende de la complejidad interna de la partícula (es decir, forma del núcleo, la cantidad y el tipo de gránulos citoplasmáticos o la rugosidad de la membrana). Algunos citómetros de flujo omiten un detector de fluorescencia y detectan solo luz dispersa. Otros citómetros de flujo forman imágenes de la fluorescencia de cada célula, luz dispersa y luz transmitida.

El subsistema de conversión del sistema de citómetro de flujo, que puede incluir uno o más amplificadores que pueden ser lineales o logarítmicos, generalmente incluye uno o más convertidores de analógico a digital ("ADC") para convertir la señal de salida del subsistema de medición en datos que luego se procesan por el ordenador.

Los citómetros de flujo modernos suelen incluir hasta cuatro (4) láseres y numerosos detectores de fluorescencia. Aumentar el número de láseres y detectores permite marcar células con varios anticuerpos diferentes y puede identificar con mayor precisión una población objetivo por sus marcadores fenotípicos. Algunos instrumentos pueden incluso capturar imágenes digitales de células individuales, permitiendo el análisis de una ubicación de señal fluorescente dentro o sobre la superficie de las células.

Iluminación de muestra

En la mayoría de los instrumentos, partículas de interés, tales como células sanguíneas o microesferas, se transportan por el flujo envolvente usando enfoque hidrodinámico a una zona de visualización dentro de una cubeta o corriente en chorro y se iluminan allí por un haz láser enfocado. La técnica proporciona los medios para identificar y contar con precisión las partículas de interés sin verse abrumado por el ruido de fondo que se produce fuera de una ventana de tiempo de registro (Practical Flow Cytometry, Howard M. Shapiro, Wiley (2003) ISBN 0471411256). Para aumentar la sensibilidad de detección, la sección transversal del haz láser enfocado suele ser elíptica, con el eje menor a lo largo de la dirección del flujo. Para mantener la integridad umbral, el perfil láser debe tener un perfil liso o en forma de campana a lo largo de la dirección del flujo. Un método común para producir un haz de este tipo es alargar un haz gaussiano circular casi colimado a lo largo de la dirección del flujo con un expansor de haz hecho de un prisma o un par de lentes cilíndricas, enfocando luego el haz hacia abajo con una lente esférica. Dado que la forma del haz en el foco es la transformada de Fourier espacial del haz en el campo lejano, esto produce un punto elíptico de forma gaussiana con eje menor a lo largo del flujo.

Los láseres convencionales son caros, voluminosos y consumen mucha energía. Más recientemente, los diodos láser ("LD") están disponibles. A diferencia de los láseres convencionales, la nueva generación de LD es rentable, compacta y eficiente energéticamente, y muestra una gran promesa para la nueva generación de instrumentos biomédicos compactos. Un LD emite luz que tiene una sección transversal elíptica con el eje mayor de la elipse, frecuentemente llamado el eje rápido, perpendicular a la unión del LD y, el eje menor de la elipse, frecuentemente llamado el eje lento, paralelo a la unión del LD. Lamentablemente, la calidad del haz de un LD típico, particularmente a lo largo de su eje rápido, deja mucho que desear, evitando su amplia aceptación en aplicaciones de citometría de flujo.

En principio, la calidad del haz de LD puede mejorarse significativamente mediante filtrado espacial. Si se coloca un pequeño agujero estenopeico o una fibra óptica monomodo en el punto focal de una lente, de modo que solo acepta el modo espacial de orden más bajo, el haz que pasa a través del agujero estenopeico o la fibra óptica monomodo tendrá una forma gaussiana casi perfecta. La patente de Estados Unidos n.º 5.788.927 divulga que un haz de este tipo puede colimarse y expandirse a continuación en la dirección del flujo a través del citómetro, y finalmente enfocarse hacia abajo a un haz gaussiano de forma elíptica con un eje menor a lo largo de la dirección del flujo. Lamentablemente, el tamaño de la instrumentación de escritorio limita el diámetro de un agujero estenopeico a menos de 5 micrómetros. El tamaño de núcleo de una fibra óptica monomodo de longitud de onda visible también tiene una dimensión similar. El desafío de fabricar un filtro espacial de precisión de este tipo y mantener su estabilidad a largo plazo no solo aumenta el coste del sistema láser basado en LD, sino que también reduce su fiabilidad.

Más recientemente, en un esfuerzo por reducir los posibles lóbulos laterales debido al efecto de borde de la apertura numérica limitada de la lente de colimación, la patente de Estados Unidos n.º 6.713.019 ("la patente '019") divulga la rotación del LD noventa grados (90°) de modo que su eje lento sea paralelo a la dirección del flujo. Una sección de difusión de haz, tal como una lente cilíndrica cóncava, luego se introduce para difundir el haz colimado en la dirección perpendicular al flujo, seguido de una sección de formación de puntos de haz, tal como una lente de enfoque esférica, para formar un punto elíptico dentro de la zona de visualización de partículas del citómetro. Como se describe en detalle en la patente '019, el haz láser después de la sección de formación de puntos es extremadamente astigmático. En concreto, el ancho del haz en la zona de visualización en la dirección perpendicular al flujo es comparable o incluso más ancho que el ancho del canal de flujo. Esto no solo reduce la cantidad de energía láser que incide sobre la partícula y, en consecuencia, la intensidad de la señal, sino que también aumenta la dispersión de fondo no deseada desde la interfaz de celda de flujo de líquido. En lugar de rotar el LD, las patentes de Estados Unidos n.º 7.385.682 y 7.561.267 divulgan el uso de una lente asférica de gran apertura numérica para la colimación de LD. Tal diseño, sin embargo, no puede corregir el efecto de franja inherente al perfil de haz del LD. Por consiguiente, actualmente existe la necesidad de un sistema óptico basado en LD simple para su uso en citómetros de flujo que pueda producir de manera fiable un haz elíptico enfocado con forma casi gaussiana a lo largo de su eje menor y un ancho a lo largo del

eje mayor.

Zona de visualización

5 Objetivo de microscopio

Los citómetros de flujo modernos incluyen un filtro espacial, generalmente un agujero estenopeico mecánico o una fibra óptica de núcleo grande, ubicado en una ubicación de imagen de una lente de objetivo para evitar que la luz de fondo no deseada entre en el detector o detectores del citómetro. Debido a que las partículas permanecen en la zona de visualización del citómetro durante unos pocos microsegundos, deben usarse objetivos de microscopio con gran apertura numérica para maximizar la eficiencia de recolección de luz. Para soportar múltiples haces láser de excitación espacialmente separados en citómetros de flujo, como se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 4.727.020, también es deseable usar un objetivo con un gran campo de visión. Para lograr estos objetivos, las patentes de Estados Unidos n.º 6.5100.07 y 7.110.192 divulgan un diseño de objetivo que usa una lente apocromática modificada con una lente de hemisferio cercano acoplada con gel o unida con epoxi como el elemento óptico más cercano a la muestra que es seguida por múltiples lentes de menisco. Si bien tales objetivos de microscopio proporcionan tanto una apertura numérica como un campo de visión satisfactorios, sacrificaron significativamente la calidad de imagen de este modo:

1. limitar el uso efectivo del filtro espacial; y
2. exhibir una pobre discriminación de luz de fondo.

Además, tales objetivos de microscopio refractivo son voluminosos, costosos de fabricar y, a menudo, presentan una aberración cromática severa. Para superar estas limitaciones, la Solicitud de Patente Publicada del Tratado de Cooperación de Patentes ("PCT") n.º WO 01/27590 divulga un diseño de objetivo alternativo basado en un espejo cóncavo esférico. El diseño ofrece una gran apertura numérica y una buena calidad de imagen a lo largo del eje óptico. Sin embargo, debido a sus malas características fuera del eje, dicho diseño no es adecuado para citómetros de flujo que tengan múltiples haces láser separados espacialmente.

Suministro de líquido envolvente

El rendimiento de un citómetro de flujo depende críticamente de un flujo envolvente de líquido estable. En concreto, los citómetros de flujo que tienen múltiples haces láser de excitación separados espacialmente o que realizan una clasificación de gotitas se basan en una velocidad constante del flujo envolvente de líquido para la sincronización de tiempo. Como se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 5.245.318, los citómetros de flujo convencionales proporcionan un flujo envolvente de líquido estable mediante el uso de un sistema fluídico hermético que:

1. aplica una presión de aire constante en un depósito de líquido envolvente para empujar el fluido a través de la celda de flujo; o
2. aspira el fluido del depósito de líquido envolvente a través de la celda de flujo usando una bomba de vacío.

Estos sistemas son voluminosos, caros de fabricar y propensos a fallar. Más recientemente, la patente de Estados Unidos n.º 8.187.888 divulga que incluye un subsistema de líquido envolvente que bombea el flujo envolvente de líquido desde el depósito de líquido envolvente a la zona de visualización y una bomba de líquido envolvente residual que bombea líquido envolvente residual desde la zona de visualización al tanque de residuos. Aunque parece que el subsistema de líquido envolvente divulgado nunca se ha utilizado en citómetros de flujo de velocidad crítica, esta patente informa que el subsistema de líquido envolvente divulgado supera la mayoría de los inconvenientes de la estabilización de flujo de líquido envolvente convencional mediante:

1. amortiguar las pulsaciones de la bomba ubicando:
 - a. un condensador fluídico entre la bomba de líquido envolvente y la celda de flujo; y
 - b. otro condensador fluídico entre la celda de flujo y la bomba de residuos; y
2. un controlador de bomba cuya operación responde a un sensor de presión que mide el diferencial de presión entre la entrada y la salida de la celda de flujo.

El subsistema de líquido envolvente divulgado tiene otras limitaciones. Por ejemplo, el sensor de presión ubicado cerca de la salida de la celda de flujo podría ser una fuente potencial de contaminación.

Bomba peristáltica

Suministro de líquido de muestra

Las bombas peristálticas son bombas volumétricas en las que un conjunto de rodillos que se mueven lineal o circularmente comprimen progresivamente un tubo compresible para impulsar el fluido a través del tubo. Las bombas peristálticas se usan ampliamente en particular para bombear fluidos limpios/estériles o agresivos para evitar la

contaminación cruzada con componentes de bomba expuestos.

La bomba peristáltica convencional exhibe una pulsación cada vez que un rodillo rueda fuera del tubo cerca de la salida de bomba, causado por el aumento temporal del volumen del tubo cuando el tubo comprimido se expande de nuevo a su forma original. La pulsación no es deseable en aplicaciones que requieren un flujo suave. Se han hecho muchos intentos en el pasado para reducir la pulsación. Por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 3.726.613 y 3.826.593 introdujeron un empujador accionado por leva que ejerce sincrónicamente una presión externa sobre el tubo para compensar la expansión del tubo. En la patente de Estados Unidos n.º 4.834.630, una pluralidad de tubos montados en rodillos segmentados se unen entre sí en la entrada y salida de la bomba mediante acopladores en forma de T de modo que las pulsaciones de los tubos individuales se reduzcan al promediar. La patente de Estados Unidos n.º 7.645.127 propuso un tubo de bomba con un diámetro interior ligeramente mayor cerca de la entrada de modo que la descompresión del tubo cerca de la salida de la bomba se compense por la compresión de un tubo de mayor volumen cerca de la entrada. Los diversos métodos aumentaron significativamente la complejidad de la bomba peristáltica o tuvieron un éxito limitado en la reducción del efecto de pulsación.

Detección de fluorescencia multicolor

En muchas instrumentaciones de detección de fluorescencia multicolor, tales como citómetros de flujo, (Practical Flow Cytometry, Howard M. Shapiro, Wiley (2003) ISBN 0471411256), la luz de fluorescencia emitida por el objeto de interés es:

1. recogida por un objetivo de microscopio;
2. de nuevo representada por una imagen a través de un pequeño agujero estenopeico o una fibra óptica multimodo;
3. luego colimada y separada en múltiples bandas coloreadas; y
4. finalmente detectada por fotodetectores tales como el tubo fotomultiplicador (PMT), fotodiodo PIN o fotodiodo de avalancha (APD).

Un PMT es esencialmente un tipo especial de tubo de electrones. Este dispositivo de la "edad anterior a los semiconductores" es voluminoso y caro. Adicionalmente, tiene una eficiencia cuántica más pobre y una respuesta espectral menos reproducible que los detectores de semiconductores basados en silicio, particularmente en la región espectral de rojo a infrarrojo cercano biológicamente importante. A pesar de las desventajas, PMT tiene excelentes características de ruido. Por ejemplo, la corriente de oscuridad de un PMT típico de 13 mm (p. ej., el R9305 de Hamamatsu Corporation de Japón) es solo de aproximadamente 1 nA. A diferencia de ello, la corriente de oscuridad de un APD sería 10 veces mayor incluso si su área activa se redujera a $1/20^{\text{ésimo}}$ de la del PMT. Como resultado, PMT ha sido el detector de luz de bajo nivel de facto en muchos citómetros de flujo de detección de fluorescencia comerciales. Solo en ciertas aplicaciones científicas donde la tasa de eventos es baja y la corriente de oscuridad puede discriminarse mediante técnicas costosas de recuento de fotones el PMT ha sido reemplazado por detectores de APD. (véase, High-Throughput Flow Cytometric DNA Fragment Sizing, A.V. Orden, R.A. Keller y W. P. Ambrose, Anal. Chem., 2000, 72 (1), pág. 37-41). Más recientemente, una matriz de APD en modo Geiger también se promocionó como reemplazo de PMT. (Por ejemplo, el contador de fotones multipíxel de Hamamatsu Photonics de Japón y el fotomultiplicador de estado sólido de SensL Inc. de Irlanda). Estos detectores, sin embargo, también tienen una corriente de oscuridad alta y son no lineales a una tasa de eventos alta.

La única industria en la que APD ha encontrado una amplia aceptación es en la comunicación óptica. Se sabe que si el área activa del APD se reduce a menos de 1 mm^2 , la corriente de oscuridad correspondiente se reducirá al mismo nivel que un PMT. En la comunicación óptica, la luz es un haz láser de fibra óptica monomodo. Un haz de este tipo puede colimarse fácilmente y luego enfocarse en un área mucho más pequeña que 1 mm^2 . Cabe señalar que los dispositivos de separación de color usados en los instrumentos de detección de luz de fluorescencia, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.683.314 y referencias en la misma, son casi idénticos en función y arquitectura a los multiplexores por división de longitud de onda (WDM) ampliamente usados en la comunicación óptica, como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 4.482.994 y 5.786.915. Una razón fundamental que impide el uso de APD de área pequeña en la instrumentación de detección de fluorescencia es el bien conocido teorema de conservación de la extensión: la luz de fluorescencia que llega a través de un agujero estenopeico o fibra óptica multimodo es una fuente de luz extendida con una extensión cientos de veces mayor que la de un haz láser de una fibra óptica monomodo. Por consiguiente, como se ilustra en la figura 26, no puede colimarse en una distancia extendida a menos que el diámetro del haz se expanda significativamente. Lamentablemente, cuanto mayor sea el diámetro del haz, mayor será el desafío técnico para enfocarlo en un punto pequeño. Dado que la separación de color eficiente solo se puede lograr económicamente con un haz de luz colimado, el APD de área pequeña no se ha considerado viable para aplicaciones de detección de luz de fluorescencia multicolor. Claramente, sería muy deseable una tecnología capaz de colimar un gran haz de luz extensible a lo largo de una distancia extendida sin expandir significativamente el diámetro del haz. Una tecnología de este tipo permitiría un dispositivo de tipo WDM para la detección de luz de fluorescencia con características comparables a los detectores de semiconductores de bajo ruido.

Divulgación

La presente divulgación proporciona un citómetro de flujo mejorado junto con diversos componentes mejorados incluidos en el mismo.

5 Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un sistema óptico basado en láser de diodo simple y fiable capaz de suministrar un haz láser enfocado de sección transversal elíptica con una distribución de intensidad de tipo gaussiana a lo largo de su eje menor y un ancho a lo largo del eje mayor optimizado para aplicaciones de citometría de flujo.

10 El alcance de la presente invención es un citómetro de flujo que comprende un objetivo de microscopio de calidad de formación de imágenes que es fácil de fabricar, tiene una larga distancia de trabajo, gran apertura numérica, gran campo de visión y mínima aberración cromática.

15 Un objeto de la presente divulgación es un sistema fluídico simple para citómetros de flujo que no solo sea fiable, compacto y fácil de fabricar, sino también capaz de soportar aplicaciones críticas de velocidad, tales como en instrumentos con múltiples haces láser de excitación separados espacialmente o en clasificadores de gotas.

Un objeto de la presente divulgación es que el diseño simple para una bomba peristáltica que puede proporcionar un flujo de líquido sin pulsos es altamente deseable.

20 Un objeto de la presente divulgación es proporcionar una bomba peristáltica con pulsación mínima.

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar una bomba peristáltica que sea simple de fabricar y operar. Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un dispositivo capaz de colimar un haz de luz desde una fuente de luz extendida a lo largo de una distancia extendida sin expandir significativamente dicho diámetro de haz. También es un objeto de la presente divulgación proporcionar un sistema de WDM que usa dicho dispositivo para separar dicho haz de luz en múltiples bandas de colores. Además, es un objeto de la presente divulgación proporcionar un sistema de WDM de este tipo que sea compatible con detectores de semiconductores de bajo ruido. Adicionalmente, debido a la diversidad de sondas fluorescentes, es un objeto de la presente divulgación proporcionar un sistema de WDM de este tipo que sea reconfigurable.

30 En el presente documento se divulga un citómetro de flujo que incluye:

1. un subsistema óptico basado en LD para hacer incidir un haz de luz sobre partículas que pasan a través de una zona de visualización;
- 35 2. un objetivo de microscopio compuesto que comprende las características divulgadas en las reivindicaciones adjuntas, para recoger y formar imágenes de luz dispersa o fluorescente por partículas que pasan a través de la zona de visualización;
3. un subsistema fluídico para suministrar un flujo envolvente de líquido a la zona de visualización;
- 40 4. una bomba peristáltica para inyectar en el flujo envolvente de líquido un flujo de muestra de líquido que transporta partículas que pasan junto con el flujo envolvente de líquido a través de la zona de visualización;
5. una fibra óptica multimodo que recibe luz dispersa y fluorescente desde la zona de visualización que el objetivo de microscopio compuesto recopila y representa con imágenes; y
- 45 6. un multiplexor por división de longitud de onda para separar ópticamente en bandas de color la luz recibida a través de la fibra óptica.

El subsistema óptico basado en LD de acuerdo con la presente divulgación para iluminar partículas que pasan a través de la zona de visualización del citómetro de flujo generalmente incluye:

- 50 1. un diodo láser orientado con su eje lento paralelo a la dirección del flujo;
2. una lente de colimación que convierte el haz divergente del LD en un haz colimado de forma elíptica con su eje mayor perpendicular al flujo;
3. un sistema de lente de enfoque que reduce el haz láser en la zona de visualización a un ancho óptimo en la dirección perpendicular al flujo; y
- 55 4. finalmente, un elemento de enfoque cilíndrico de alta potencia colocado en las proximidades de la zona de visualización con su eje perpendicular a la dirección del flujo.

60 El elemento de enfoque cilíndrico de alta potencia transpone el perfil de campo lejano del LD a lo largo de su eje lento a su conjugada de Fourier en la zona de visualización a lo largo de la dirección del flujo, mientras mantiene el perfil de haz transversal, de modo que el perfil del haz láser en la zona de visualización sea óptimo para aplicaciones de citometría de flujo.

65 El citómetro de flujo de acuerdo con la presente invención comprende un objetivo de microscopio compuesto que tiene las características divulgadas en la reivindicación 1. En una realización, la zona de visualización está ubicada dentro de una celda de flujo provista por una cubeta de vidrio rectangular con un pequeño canal rectangular a través del cual fluye un líquido que transporta partículas. El espejo cóncavo está hecho de un material ópticamente transparente, tales como vidrio o plásticos de calidad óptica, de forma plano-convexa con un revestimiento altamente reflectante en

el lado convexo para reflexión interna. El lado plano del espejo está acoplado con gel o unido a una superficie lateral de la cubeta. La placa de compensación plano-asférica está hecha de un material transparente, tales como vidrio o plásticos de calidad óptica, con el lado plano acoplado en gel o unido al lado opuesto de la cubeta. El espejo con forma plano-convexa y la placa de compensación esférica también pueden formarse integralmente con la cubeta. Todavía en otra realización de la presente divulgación, la zona de visualización está en una corriente en chorro tanto con el espejo cóncavo como la placa de compensación independientes de la zona de visualización, y el espejo es preferentemente un espejo cóncavo de superficie frontal.

El sistema fluídico de acuerdo con la presente divulgación generalmente incluye un depósito de líquido envolvente del que una bomba de líquido extrae líquido envolvente. A continuación, el líquido envolvente fluye desde la bomba de líquido hasta una entrada de un acoplamiento en T. Un brazo de salida del acoplamiento en T se conecta a una derivación que devuelve una fracción del líquido envolvente bombeado de vuelta al depósito de líquido envolvente con el líquido envolvente devuelto fluyendo hacia el aire dentro del depósito de líquido envolvente. Un segundo brazo de salida del acoplamiento en T se conecta a una ruta envolvente que incluye una cápsula de depósito seguida de un filtro de partículas y luego la celda de flujo. El líquido envolvente que sale de la celda de flujo luego va al tanque de residuos. La resistencia fluídica a lo largo de la derivación está diseñada para ser menor que la resistencia fluídica a lo largo de la ruta envolvente. Por consiguiente, solo una pequeña fracción del líquido envolvente pasa a través de la celda de flujo. Obsérvese que el caudal envolvente típico en las aplicaciones de citometría de flujo es de unas pocas decenas de mililitros por minuto. Por lo tanto, la derivación permite usar bombas de líquido de mayor caudal que no solo son mucho menos costosas y más confiables, sino que también opera a una frecuencia de pulsación más alta que es mucho más fácil de atenuar. Dado que la salida de la ruta de derivación se conecta al aire, también sirve como un gran condensador fluídico para reducir significativamente la pulsación en el líquido envolvente que fluye a lo largo de la ruta envolvente. Durante el funcionamiento, la porción de entrada del cartucho de filtro está llena de aire. Por lo tanto, el cartucho de filtro también sirve como condensador fluídico, para reducir aún más la pulsación en el líquido envolvente en la celda de flujo a un nivel insignificante. Debido a la gran resistencia fluídica en la celda de flujo, el aire atrapado cerca de la entrada del cartucho de filtro se comprime. Si la bomba de líquido está apagada, el aire comprimido en el cartucho de filtro que se empuja hacia el depósito de líquido envolvente se almacena en la cápsula de depósito cuyo tamaño se elige para evitar que el aire atrapado alcance el acoplamiento en T.

La bomba peristáltica de acuerdo con la presente divulgación generalmente incluye una pluralidad de rodillos ubicados en la periferia de un rotor que mueve los rodillos circularmente dentro de una pista curvada arqueada de una carcasa y una cuba compresible que los rodillos comprimen contra la pista. En una realización de la presente divulgación, la pista de la carcasa de bomba peristáltica tiene un rebaje, por lo que el tubo compresible se descomprime progresivamente hasta la expansión completa y luego se comprime hasta el cierre completo cada vez que uno de los rodillos se mueve más allá del rebaje. La ubicación y la forma del rebaje mantienen el volumen total de líquido dentro del tubo compresible desde el rebaje hasta la salida de la bomba sustancialmente invariable. El efecto de la expansión del tubo a medida que un rodillo se mueve más allá de la salida de la bomba se compensa por la compresión del tubo cuando otro rodillo diferente inmediatamente aguas arriba de la salida de la bomba se mueve hacia la sección de compresión del rebaje. En otra realización de la presente divulgación, la pista de la carcasa de bomba puede contener una pluralidad de rebajes, proporcionando una pluralidad de rodillos aguas arriba de la salida de la bomba para modificar progresivamente la compresión del tubo en múltiples secciones a lo largo del tubo compresible. Las ubicaciones y formas de la pluralidad de rebajes están diseñadas de tal manera que la modificación de la compresión del tubo en estas secciones compense sustancialmente el efecto debido a la expansión del tubo cerca de la salida de la bomba. Todavía en otra realización de la presente divulgación, el tubo compresible se mantiene completamente cerrado debajo del rodillo excepto en las secciones de entrada y salida. Se usa un motor de velocidad variable para accionar la bomba. Cuando un rodillo alcanza la sección de salida, la rotación del motor se acelera programáticamente para compensar la expansión del tubo.

El multiplexor por división de longitud de onda ("WDM") de acuerdo con la presente divulgación generalmente incluye al menos dos elementos ópticos. El primer elemento óptico colima un haz de luz recibido desde una fuente de luz extendida, tal como la luz desde un agujero estenopeico o desde una fibra óptica multimodo. El primer elemento óptico magnifica la fuente de luz extendida, por ejemplo, como se define por el agujero estenopeico, o el núcleo de la fibra óptica multimodo, a una imagen que tiene un tamaño similar a la sección transversal efectiva del primer elemento óptico, creando así un haz de luz colimado entre el primer elemento óptico y su imagen. Un segundo elemento óptico se coloca cerca de la imagen y retransmite el primer elemento óptico con aumento unitario a lo largo de la trayectoria óptica. De esta manera, el segundo elemento óptico duplica efectivamente la longitud de trayectoria colimada. También pueden incluirse elementos ópticos adicionales en la misma configuración de retransmisión de imagen 1:1 en la presente divulgación para ampliar adicionalmente la trayectoria óptica colimada. La arquitectura de retransmisión de imagen de aumento unitario en cascada de la presente divulgación proporciona una gran extensión de la longitud de la trayectoria óptica colimada sin una gran expansión del haz. Como resultado, las técnicas de WDM bien establecidas en la industria de la comunicación óptica pueden adaptarse fácilmente para la detección de luz de fluorescencia. En concreto, múltiples bandas de colores presentes en el haz de luz se pueden separar usando filtros dicróicos, ubicados a lo largo de la trayectoria óptica con la luz separada enfocada estrechamente en pequeños puntos compatibles con fotodetectores de semiconductores de bajo ruido.

En una realización de WDM, el primer elemento óptico es una lente y el segundo elemento es un espejo cóncavo,

aunque es evidente para los expertos en la materia que también se pueden usar otros tipos de componentes ópticos refractivos y/o reflectantes para lograr el mismo objetivo de diseño. Similar a su contraparte en la comunicación óptica, la trayectoria óptica en el WDM de la presente divulgación puede plegarse usando filtros dicróicos. En una realización de la presente divulgación, la trayectoria de la luz se pliega en una configuración en zigzag. Preferentemente, para

5 facilitar la reconfiguración fiable del citómetro de flujo, cada filtro dicróico está unido a un soporte mecánico que tiene una superficie de referencia que es ópticamente paralela a la superficie reflectante del filtro. Como resultado, todos los filtros del WDM se pueden colocar con precisión a lo largo de la trayectoria óptica haciendo referencia al soporte del filtro contra un plano óptico común.

10 En otra realización de la presente divulgación, el haz colimado que pasa a través del filtro dicróico se ramifica aún más en múltiples bandas de colores usando filtros dicróicos secundarios. Es evidente para los expertos en la materia que los filtros dicróicos pueden insertarse en cualquier lugar a lo largo de la trayectoria de haz larga, estrecha y colimada proporcionada por la formación de imágenes de retransmisión de la presente divulgación para permitir de ese modo entregar un haz estrechamente enfocado a los fotodetectores usando una variedad de configuraciones ópticas, tal

15 como la configuración en estrella analizada en la patente de Estados Unidos n.º 6.683.314, la configuración ramificada analizada en la patente de Estados Unidos n.º 4.727.020 y otros tipos de configuración óptica de WDM ampliamente practicados en la industria de la comunicación óptica. En lugar de espejos cóncavos, el WDM puede reemplazarse por filtros dicróicos curvos para aumentar aún más el número de bandas coloreadas seleccionadas por el WDM.

20 Estas y otras características, objetos y ventajas se entenderán o serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada de la realización preferida como se ilustra en las diversas figuras de los dibujos.

La presente invención es un citómetro de flujo definido por las reivindicaciones adjuntas.

25

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que ilustra esquemáticamente una realización preferida de un citómetro de flujo de acuerdo con la presente invención que incluye:

30

- a) un subsistema de iluminación óptica basado en LD;
- b) un objetivo de microscopio compuesto que comprende las características divulgadas en las reivindicaciones adjuntas, sobre el que incide la luz emitida desde el subsistema de iluminación óptica basado en LD, teniendo el objetivo de microscopio compuesto un canal de paso de fluido formado a través del mismo con una zona de visualización de iluminación de partículas ubicada dentro de una cubeta del mismo;
- 35 c) un sistema fluídico para suministrar un flujo libre de pulsaciones de líquido envolvente al canal de paso de fluido formado a través del objetivo de microscopio compuesto;
- d) una bomba peristáltica para introducir un flujo libre de pulsaciones de líquido de muestra que transporta células o partículas a analizar en el flujo envolvente de líquido suministrado por el sistema fluídico; y
- 40 e) un multiplexor por división de longitud de onda ("WDM") que tiene una configuración en zigzag para separar un haz de luz en varias bandas de colores diferentes, recibiendo el WDM a través de una luz de fibra óptica que se dispersa desde las células o partículas a medida que pasan a través del canal de paso de fluido del objetivo de microscopio compuesto y se iluminan en el mismo por la luz emitida desde el subsistema de iluminación óptica basado en LD.

45

La figura 2 es una vista esquemática que representa un LD emisor de borde de alta potencia típico que ilustra los ejes rápido y lento de la luz emitida desde el mismo.

La figura 2A muestra un perfil de campo lejano típico para un haz láser emitido desde el chip de LD representado en la figura 2.

50 La figura 3A representa una vista tridimensional de un subsistema convencional de iluminación óptica basado en LD de la técnica anterior para instrumentos de citometría de flujo junto con la celda de flujo del sistema.

La figura 3B representa un perfil típico dependiente del tiempo de dispersión de luz desde una célula o partícula que pasa a través del haz láser representado en la figura 3A en el foco del mismo dentro de la celda de flujo del sistema.

55 La figura 4A es una vista en alzado de una configuración alternativa de subsistema de iluminación óptica basado en LD de la técnica anterior a través del líquido que fluye a través del canal de paso de fluido que mejora el perfil de haz en el foco del mismo en la zona de visualización del sistema de citómetro de flujo.

La figura 4B es una vista en planta a lo largo del líquido que fluye a través del canal de paso de fluido del subsistema de iluminación óptica basado en LD de la técnica anterior alternativo representado en la figura 4A.

60 La figura 5A es una vista en alzado a través del líquido que fluye a través del canal de paso de fluido del objetivo de microscopio compuesto representado en la figura 1 en donde el eje lento del LD está orientado transversalmente al flujo de líquido.

La figura 5B es una vista en planta a lo largo del líquido que fluye a través del canal de paso de fluido del objetivo de microscopio compuesto representado en la figura 1 en donde el eje lento del LD está orientado transversalmente al flujo de líquido.

65

La figura 5C representa un perfil típico dependiente del tiempo de dispersión de luz desde una célula o partícula

que pasa a través del canal de paso de fluido del objetivo de microscopio compuesto representado en la figura 1. La figura 6 es una vista en perspectiva de una realización alternativa de un subsistema de iluminación óptica basado en LD que no cae dentro del alcance de la presente invención, adaptado para su uso en un sistema de citómetro de flujo en el que una corriente en chorro de líquido pasa a través de la zona de visualización.

5 La figura 6A es una vista en perspectiva ampliada de la realización alternativa de un subsistema de iluminación óptica basado en LD que representa con mayor detalle la corriente en chorro de líquido que pasa a través de la zona de visualización.

10 La figura 7 es una vista en perspectiva de un subsistema de iluminación óptica basado en LD de realización alternativa de acuerdo con la presente divulgación adaptado para su uso en un sistema de citómetro de flujo que orienta el eje lento del LD paralelo a la dirección del líquido que fluye a través del canal de paso de fluido del objetivo de microscopio compuesto representado en la figura 1.

15 La figura 8 es una vista en perspectiva de un objetivo de microscopio compuesto de acuerdo con la presente divulgación adaptado para su uso en el sistema de citómetro de flujo de acuerdo con la presente invención representado en la figura 1, teniendo el objetivo de microscopio compuesto un canal de paso de fluido formado a través del mismo con la zona de visualización de iluminación de partículas ubicada dentro de una cubeta en el mismo.

20 La figura 9A es una vista en alzado en sección transversal del objetivo de microscopio compuesto tomada a lo largo de la línea 9A-9A en la figura 8 que incluye trazas de rayos desde tres (3) ubicaciones separadas espacialmente en la zona de visualización hasta un plano de imagen para el objetivo que ilustra la dispersión y la propagación de emisión de fluorescencia.

Las figuras 9B1-9B3 son diagramas de puntos cerca del plano de imagen representado en la figura 9A para las tres (3) ubicaciones de emisión de luz separadas espacialmente representadas en la figura 9A.

25 La figura 10 es una vista en alzado en sección transversal similar a la de la figura 9A para un objetivo de microscopio compuesto de realización alternativa de acuerdo con el citómetro de flujo de acuerdo con la presente invención que incluye trazas de rayos desde tres (3) ubicaciones espacialmente separadas en una zona de visualización en el mismo a un plano de imagen para el objetivo que ilustra la dispersión y propagación de emisión de fluorescencia.

30 La figura 11 es una vista en perspectiva de otra realización alternativa más de un objetivo de microscopio compuesto de acuerdo con la presente divulgación adaptado para su uso en el sistema de citómetro de flujo de acuerdo con la presente invención representado en la figura 1, teniendo el objetivo de microscopio compuesto de realización alternativa un canal de paso de fluido formado a través del mismo con la zona de visualización de iluminación de partículas ubicada dentro de una cubeta en el mismo.

35 La figura 12 es una vista en perspectiva de otra realización alternativa más de un objetivo de microscopio compuesto de acuerdo con la presente divulgación adaptado para su uso en el sistema de citómetro de flujo de acuerdo con la presente invención representado en la figura 1, estando adaptado el objetivo de microscopio compuesto de realización alternativa para una zona de visualización que está ubicada dentro de la corriente en chorro representada en las figuras 6 y 6A.

40 La figura 13 es una vista en perspectiva de otra realización alternativa más de un objetivo de microscopio compuesto que no cae dentro del alcance de la presente invención, adaptado para su uso en donde una zona de visualización está ubicada en la superficie de un portaobjetos de microscopio.

La figura 14 es un diagrama esquemático que representa un subsistema fluídico de acuerdo con la presente divulgación para suministrar un flujo envolvente de líquido estable a una celda de flujo de citómetros de flujo que incluye:

- 45
1. una pequeña cápsula ubicada entre una bomba de líquido envolvente y la celda de flujo; y
 2. un filtro de partículas ubicado entre la cápsula pequeña y la celda de flujo,

tanto el filtro de partículas como la cápsula pequeña proporcionan depósitos de aire para amortiguar las pulsaciones de la bomba.

50 La figura 15 es un diagrama esquemático que representa un subsistema fluídico de realización alternativa similar al ilustrado en la figura 14 que reemplaza la cápsula pequeña con una longitud de tubería para proporcionar un depósito de aire.

55 Las figuras 16A y 16B son histogramas que comparan tiempos de vuelo de partículas medidos en la celda de flujo cuando la porción de entrada del filtro de partículas tiene aire atrapado en su interior (figura 16A), y cuando no hay aire dentro del subsistema fluídico entre la bomba de líquido envolvente y la celda de flujo (figura 16B).

La figura 17 es una vista en perspectiva de una bomba peristáltica de 3 rodillos de acuerdo con la presente divulgación que representa los rodillos de la bomba, el tubo y carcasa de bomba circundante.

Las figuras 18A a 18D representan vistas simplificadas para varios estados de la bomba peristáltica de 3 rodillos representada en la figura 17 con los rodillos en diferentes ubicaciones.

60 Las figuras 19 es una vista en sección transversal longitudinal detallada del tubo de la bomba peristáltica que se comprime parcialmente por el rodillo de la bomba.

La figura 19A y 19B son vistas detalladas en sección transversal ortogonales a la longitud del tubo de la bomba peristáltica tomadas a lo largo de las líneas 19A y 19B en la figura 19 que ilustran la compresión parcial del tubo por el rodillo.

65 Las figuras 20A y 20B son diagramas esquemáticos que ilustran los rodillos y el tubo de la bomba vistos a lo largo de las coordenadas circulares de la bomba para representar la falta de pulso proporcionado por la bomba

peristáltica.

La figura 21 es un gráfico que representa la relación funcional con respecto a la posición del rodillo cuando sale rodando de la sección de salida del tubo compresible de:

- 5 1. el volumen total de líquido en la mitad de salida de la bomba; así como
2. los volúmenes de líquido en la bomba:
 - a. sección de rebaje; y
 - b. sección de salida.

10 La figura 22 es una vista en planta simplificada de una bomba peristáltica de 4 rodillos de acuerdo con la presente divulgación.

La figura 23 es una vista en planta simplificada de una bomba peristáltica de 6 rodillos de acuerdo con la presente divulgación.

15 La figura 24A es una ilustración en sección transversal longitudinal de rodillos y un tubo compresible para una bomba peristáltica de 3 rodillos de minimización de pulsaciones de acuerdo con la presente divulgación que tiene un rotor con velocidad programable.

La figura 24B es una vista en planta simplificada que ilustra la bomba peristáltica de 3 rodillos de minimización de pulsaciones de acuerdo con la presente divulgación que tiene un rotor con velocidad programable.

20 La figura 24C es un gráfico que representa la bomba peristáltica de minimización de pulsaciones representada en la figura 24B que tiene un rotor de velocidad programable:

1. tasa de cambio de volumen negativa con respecto a la posición del rodillo;
2. velocidad del rotor; y
- 25 3. caudal de la bomba.

La figura 25 es un diagrama que ilustra el trazado de rayos ópticos para un multiplexor por división de longitud de onda ("WDM") de 6 puertos ilustrativo que usa una configuración en zigzag de acuerdo con la presente divulgación.

30 La figura 26 es un diagrama que ilustra el trazado de rayos de dispositivos de colimación de la técnica anterior que muestra la limitación del dispositivo para colimar una fuente de luz extendida.

La figura 27 es una ilustración en perspectiva de una realización de un WDM de 6 puertos que usa una combinación de configuraciones en zigzag y ramificadas de acuerdo con la presente divulgación.

La figura 28 es una ilustración en perspectiva de otra realización de un WDM que tiene filtros dicróicos cóncavos de acuerdo con la presente divulgación.

35 Las figuras 29A y 29B son ilustraciones en perspectiva que representan el proceso de ensamblaje para construir un conjunto de filtro dicróico reemplazable para un WDM reconfigurable de acuerdo con la presente divulgación.

La figura 29C es una ilustración en perspectiva de un conjunto de filtro dicróico reemplazable construido de acuerdo con las ilustraciones de las figuras 29A y 29B.

40 Las figuras 30A y 30B son ilustraciones en perspectiva de un WDM de acuerdo con la presente divulgación que representan la instalación en el WDM del conjunto de filtro dicróico reemplazable representado en la figura 29C y su retirada del mismo.

Mejor modo para llevar a cabo la divulgación

45 Citómetro de flujo

La figura 1 representa un citómetro de flujo de acuerdo con la presente invención identificado por el número de referencia general 40. El citómetro de flujo 40 incluye:

- 50 1. un subsistema óptico basado en LD 50;
2. un objetivo de microscopio compuesto 60 que comprende las características divulgadas en las reivindicaciones adjuntas;
3. un subsistema fluídico 70 para suministrar un flujo envolvente de líquido;
4. una bomba peristáltica 80 para inyectar un flujo de muestra líquida que contiene partículas a analizar en el flujo envolvente de líquido suministrado por el subsistema fluídico 70, el flujo de muestra de líquido que se enfoca hidrodinámicamente por el flujo envolvente de líquido pasa a través de una zona de visualización con el objetivo de microscopio compuesto 60 recopilando y formando imágenes de luz dispersada y/o fluorescente por partículas en la zona de visualización;
- 55 5. una fibra óptica 852 que recibe luz dispersa y/o fluorescente por partículas en la zona de visualización que el objetivo de microscopio compuesto 60 recopila y representa con imágenes; y
- 60 6. un multiplexor por división de longitud de onda 90 ("WDM 90") para procesar ópticamente la luz dispersa y/o fluorescente recibida desde la fibra óptica 852.

Subsistema óptico 50

65 El subsistema óptico 50 incluye un LD 501 que, como se representa con mayor detalle en la figura 2, emite un haz de

luz divergente desde un borde del mismo. Como se representa más gráficamente en las figuras 2 y 2A, el haz de luz divergente tiene un perfil en sección transversal de forma elíptica con un eje mayor, también conocido como el eje rápido, y un eje menor, también conocido como el eje lento. El haz de luz divergente emitido desde el LD 501 incide sobre una lente de colimación 502 que convierte el haz de luz divergente emitido por el LD 501 en un haz de luz colimado que tiene una sección transversal elíptica. Aunque no es esencial, el subsistema óptico 50 también puede incluir un espejo opcional 503 colocado para dirigir el haz de luz elíptico colimado hacia el objetivo de microscopio compuesto 60. Una lente plano convexa 504, colocada cerca del objetivo de microscopio compuesto 60, reduce el eje mayor del haz de luz de forma elíptica que está orientado perpendicular a la dirección en la que la muestra de líquido y el flujo envolvente de líquido circundante fluyen a través de la zona de visualización dentro del objetivo de microscopio compuesto 60. En la zona de visualización, la anchura del haz de luz de forma elíptica:

1. perpendicular a la dirección en la que el flujo de muestra de líquido pasa a través de la zona de visualización es preferentemente ligeramente menor que el ancho del flujo envolvente de líquido; mientras que
2. todavía lo suficientemente ancho para que las partículas en el flujo de muestra pasen a través de una porción casi plana del haz de luz con forma elíptica a la intensidad máxima del haz.

De conformidad con la presente divulgación, es evidente para los expertos en la materia que la lente plano convexa 504 puede reemplazarse por otros tipos de elementos ópticos, tales como una lente doblete acromática o una combinación de lentes esféricas, lentes cilíndricas y/o pares de prismas. Alternativamente, el espejo 503 y la lente 504 también pueden reemplazarse por un espejo cóncavo. Para aplicaciones sensibles a la polarización del citómetro de flujo 40, un elemento de acondicionamiento de polarización opcional, tal como una placa de media onda, también puede colocarse en la sección colimada del haz de luz que se extiende desde la lente de colimación 502 hasta la lente 504. Por último, antes de pasar a través de la zona de visualización, el haz de luz pasa a través de una lente cilíndrica de alta potencia 505, que se coloca adyacente a la zona de visualización. Como se representa en la figura 1, el eje de la lente cilíndrica 505 está orientado perpendicular a la dirección en la que el flujo de muestra de líquido pasa a través de la zona de visualización, y la longitud focal de la lente cilíndrica 505 produce un enfoque ajustado del eje menor del haz de luz en la zona de visualización.

Una ventaja del subsistema óptico 50 en comparación con el subsistema óptico basado en LD convencional puede discernirse más claramente en las figuras 2 y 2A. La mayoría de los diodos láser disponibles comercialmente adecuados para su uso en un citómetro de flujo emiten un haz de luz desde un borde del mismo. Como se representa en la figura 2, una sección de ganancia 509 de dicho chip de LD 510 está altamente confinada en la dirección transversal indicada por una flecha 511. Por consiguiente, para lograr una alta potencia de salida, los fabricantes de LD a menudo sacrifican la calidad del haz, particularmente a lo largo de la dirección del eje transversal o rápido que está orientada paralela a la flecha 511. La figura 2A muestra esta característica de luz emitida desde un LD en donde múltiples franjas 512 debido al confinamiento de ganancia son claramente visibles en el campo lejano en la dirección del eje menor del haz de luz emitido. Cabe señalar que las franjas 512 que aparecen en la ilustración de la figura 2A contienen solo una cantidad diminuta de energía total en el haz de luz y, por lo tanto, tienen poco impacto en la caracterización M cuadrada convencional del perfil de haz correspondiente. Sin embargo, como se expone con mayor detalle a continuación, las franjas 512 tienen un efecto perjudicial sobre el rendimiento de los citómetros de flujo convencionales. Alternativamente, el confinamiento de ganancia a lo largo de la dirección del eje lento de un borde que emite LD que está orientado perpendicular a la flecha 511 es mucho más relajado. Por consiguiente, como se muestra en la figura 2A, el perfil del haz de campo lejano es mucho más suave a lo largo del eje lento del haz de luz del LD.

La figura 3A representa un subsistema óptico basado en LD convencional para un citómetro de flujo. Esos elementos representados en la figura 3A que son comunes al subsistema óptico 50 ilustrado en la figura 1 llevan el mismo número de referencia distinguido por una designación prima ('). Como se representa en la figura 3A, el subsistema óptico convencional orienta el eje rápido del LD 501 paralelo a la dirección en la que el flujo de muestra de líquido pasa a través de la zona de visualización. En su configuración más simplificada, el perfil de haz elíptico del LD 501' se transpone directamente por la lente de enfoque esférica 504' a la zona de visualización. En un intento de lograr una relación de aspecto óptima para el haz de luz enfocado, diversos subsistemas ópticos basados en LD convencionales diferentes también han incluido elementos ópticos de conformación de haces además de los representados en la figura 3A

El efecto perjudicial de las franjas 512 a lo largo del eje rápido del LD 501' para configuraciones de subsistemas ópticos convencionales aparece claramente en el perfil de tiempo de dispersión de luz representado en la figura 3B. Dado que la intensidad de dispersión o fluorescencia es directamente proporcional a la potencia láser local que incide sobre una partícula, cualquier estructura fina en el perfil del haz de luz a lo largo de la dirección en la que el flujo de muestra de líquido pasa a través de la zona de visualización aparecerá en el perfil de tiempo de la señal producida por el citómetro de flujo. Tales estructuras en el perfil de tiempo son indistinguibles de las señales generadas por partículas pequeñas y, por lo tanto, harán que el citómetro de flujo se active falsamente e identifique erróneamente las partículas. Adicionalmente, las franjas 512 también darán lugar a incertidumbre en la medición de otros parámetros citométricos, tal como en el área y ancho del pulso representado en la figura 3B.

Las figuras 4A y 4B representan otro subsistema óptico de la técnica anterior más para aplicaciones de citometría de

flujo basadas en LD desveladas en la patente '019 identificada anteriormente. Esos elementos representados en las figuras 4A y 4B que son comunes al subsistema óptico 50 ilustrado en la figura 1 o 3A llevan el mismo número de referencia distinguido por una designación de doble prima ("'). Como se representa en las figuras 4A y 4B, al orientar el eje lento del LD 501" paralelo a la dirección en la que el flujo de muestra de líquido pasa a través de la zona de visualización, el subsistema óptico representado en las figuras 4A y 4B supera eficazmente el problema causado por las franjas 512 como se ha descrito anteriormente. Lamentablemente, el elemento difusor de haz 513" colocado antes de la lente de enfoque esférica 504" en las figuras 4A y 4B para difundir el haz de luz perpendicular a la dirección en la que el flujo de muestra de líquido pasa a través de la zona de visualización produce un haz de luz altamente astigmático cerca de la zona de visualización. Específicamente, enfocar este haz de luz astigmático en la zona de visualización en la dirección en la que el flujo de muestra de líquido pasa a través de la zona de visualización aumenta el ancho del haz de luz perpendicular a la dirección en la que el flujo de muestra de líquido pasa a través de la zona de visualización para que el ancho del haz se vuelva similar o incluso más ancho que el flujo envolvente. Por consiguiente, el subsistema óptico representado en las figuras 4A y 4b no solo disminuyó la cantidad de energía luminosa que incide sobre las partículas que fluyen a través de la zona de visualización, el subsistema óptico también aumenta la dispersión indeseable de la luz desde la interfaz entre el flujo envolvente de líquido y las partes adyacentes del objetivo de microscopio compuesto 60.

La figura 5 destaca las principales diferencias entre el subsistema óptico divulgado en la patente '019 y el subsistema óptico 50 representado en la figura 1. En lugar de colocar un elemento difusor de haz fuera de plano 513" antes de la lente de enfoque de haz esférico 504 como se muestra en la figura 4, la lente cilíndrica de alta potencia 505, representada en las figuras 5A y 5B como una lente plano-convexa cilíndrica, se coloca a lo largo del haz de luz después de la lente de enfoque de haz esférico 504 y se yuxtapone preferentemente con el objetivo de microscopio compuesto 60. Como se muestra en las figuras 5A y 5B, la lente cilíndrica 505 enfoca el eje menor del haz de luz en la zona de visualización mientras deja el eje mayor del haz de luz esencialmente sin cambios. Por consiguiente, el subsistema óptico 50 representado en las figuras 1, 5A y 5B establece un haz de perfil de luz en la zona de visualización que es elíptico con:

1. un eje menor estrechamente enfocado que se extiende a través de los flujos combinados de muestra líquida y envoltura; y
2. un perfil de eje menor suave en la dirección de los flujos combinados de muestra de líquido y envolvente que es la conjugada de Fourier del perfil de haz de campo lejano a lo largo del eje lento de LD 501.

Mientras tanto, como se muestra en la figura 5B, el ancho de haz fuera del plano no se ve afectado por la lente cilíndrica 505. La figura 5C muestra un perfil de tiempo medido de la luz dispersa desde una micropartícula usando el subsistema óptico 50 representado en las figuras 1, 5A y 5B. El LD 501 usado al realizar la medición presentada en la figura 5C es el mismo que el usado para generar el perfil de tiempo medido de la luz dispersa desde una micropartícula que aparece en la figura 3B. Como se muestra en la figura 5C, los lóbulos laterales provocados por las franjas 512 a lo largo del eje rápido del LD 501 ya no tienen ningún efecto material sobre el rendimiento del citómetro de flujo 40.

La figura 6 representa otro subsistema óptico basado en láser de diodo alternativo más que no cae dentro del alcance de la presente invención. Esos elementos representados en las figuras 6 y 6A que son comunes al subsistema óptico 50 ilustrado en las figuras 1, 5A y 5B llevan el mismo número de referencia distinguido por una designación de triple prima (""). El subsistema óptico 50"" representado en las figuras 6 y 6A es casi idéntico al mostrado en las figuras 1, 5A y 5B, excepto que la zona de visualización se produce sin un objetivo de microscopio compuesto 60 porque se produce en una corriente en chorro de flujo libre 519 que incluye tanto los flujos de muestra como envolvente que se emiten desde una boquilla 518. Por consiguiente, para la configuración del subsistema óptico 50"" representado en las figuras 6 y 6A, la lente cilíndrica de alta potencia 505 está separada de la zona de visualización que está ubicada dentro de la corriente en chorro 519.

En las realizaciones ilustrativas de la presente divulgación representadas en las figuras 1, 5A, 5B, 6 y 6A, el eje menor, es decir, el eje lento, del LD 501 está orientado perpendicular a la dirección en la que el flujo de muestra de líquido pasa a través de la zona de visualización. Sin embargo, será evidente para los expertos en la materia que usando una configuración óptica alternativa, el eje mayor, es decir, el eje rápido, del LD 501 puede reorientarse para que sea perpendicular a la dirección en la que el flujo de muestra de líquido pasa a través de la zona de visualización. La figura 7 representa un ejemplo de una configuración alternativa de elementos ópticos. Esos elementos representados en la figura 7 que son comunes al subsistema óptico 50 ilustrado en las figuras 1, 5A, 5B, 6 y 6A, llevan el mismo número de referencia distinguido por una designación cuádruple prima (""). Como se muestra, el eje lento del LD 501"" está orientado en la dirección z. El haz de luz emitido desde el LD 501"" se gira a continuación a la dirección y en el plano mediante un par de espejos de reflexión de noventa grados (90°) 523a y 523b. En la ilustración de la figura 7, una normal al primer espejo de reorientación de haz de luz de forma elíptica 523a está orientada en el plano x-y a cuarenta y cinco grados (45°) con respecto al eje x, y una normal al segundo espejo de reorientación de haz de luz de forma elíptica 523b está orientada en el plano y-z a cuarenta y cinco grados (45°) con respecto al eje z.

Objetivo de microscopio compuesto 60

La figura 8 representa una realización de acuerdo con el citómetro de flujo de la presente invención para el objetivo

de microscopio compuesto 60 representado en las figuras 1, 5A, 5B y 7. Como se representa en la figura 8, el objetivo de microscopio compuesto 60 forma imágenes de una zona de visualización que está ubicada dentro de una cubeta de vidrio de forma prismática 603 dentro de un pequeño canal de flujo 604, que preferentemente tiene una forma de sección transversal rectangular, a través del cual pasa la partícula que lleva flujos combinados de muestra de líquido y envoltura. Un espejo de superficie posterior plano cóncavo 601 incluido en el objetivo de microscopio compuesto 60 está hecho de un material ópticamente transparente que tiene preferentemente un índice de refracción similar al de la cubeta de vidrio 603, tales como vidrio o plásticos de calidad óptica. Para minimizar la pérdida óptica, el espejo de superficie posterior 601 incluye una superficie frontal plana que está ópticamente acoplada a una superficie plana colindante de la cubeta de forma prismática 603. El acoplamiento óptico del espejo de superficie posterior 601 a la cubeta 603 puede emplear un gel de coincidencia de índice, adhesivo óptico o unión óptica directa. Alternativamente, el espejo de superficie posterior 601 también puede formarse integralmente con la cubeta 603.

El objetivo de microscopio compuesto 60 también incluye una placa correctora plano-asférica 602 que también está hecha de un material ópticamente transparente que tiene preferentemente un índice de refracción similar al de la cubeta de vidrio 603, tales como vidrio o plásticos de calidad óptica. Para reducir la pérdida óptica, una superficie plana de la placa correctora 602 puede acoplarse ópticamente a una superficie plana colindante de la cubeta de forma prismática 603 en una cara de la misma que es diametralmente opuesta al espejo de superficie posterior 601. El acoplamiento óptico de la placa correctora 602 a la cubeta 603 puede emplear un gel de coincidencia de índice, adhesivo óptico o unión óptica directa. La superficie esférica de la placa correctora 602 más alejada de la placa correctora 602 puede llevar un revestimiento antirreflectante para reducir la pérdida de transmisión óptica, aunque dicho revestimiento no es un requisito obligatorio para un objetivo de microscopio compuesto 60 de acuerdo con la presente divulgación. La forma de la superficie esférica de la placa correctora 602 es similar a la de una cámara Schmidt clásica, (Schmidt, B., Mitt. Hamburg Sternwart 7 (36) 1932). Como saben los expertos en la materia, la placa correctora de una cámara Schmidt incluye una zona neutra de forma circular donde la placa correctora no desvía los rayos de luz que pasan a través de la placa. Para su uso en el objetivo de microscopio compuesto 60, fuera de la zona neutra de la placa correctora 602, donde el espesor de la placa es más delgado, la placa correctora 602 tiene potencia óptica negativa mientras que dentro de la zona neutra la placa correctora 602 tiene potencia óptica positiva. La forma exacta de la placa correctora esférica 602 puede obtenerse fácilmente usando cualquier herramienta de trazado de rayos ópticos disponible comercialmente por cualquier experto en la materia. Obsérvese que en el citómetro de flujo 40 el haz de luz generado por el subsistema óptico 50 representado en las figuras 1, 5A, 5B y 7 entra en la cubeta 603 perpendicularmente al canal de flujo 604 a través de una (1) de las dos (2) caras de la cubeta 603 que no hacen tope con el espejo de superficie posterior 601 o la placa correctora 602.

La figura 9A representa el resultado del trazado de rayos para la realización del objetivo de microscopio compuesto 60 ilustrado en la figura 8. Como se representa en la figura 9A, la emisión de dispersión y fluorescencia desde tres (3) ubicaciones espacialmente separadas en el canal de flujo 604 cerca del centro de la cubeta 603:

1. se propaga inicialmente hacia el espejo de superficie posterior 601 para reflejarse internamente por el espejo de superficie posterior 601;
2. luego pasa primero a través de la cubeta 603;
3. pasa posteriormente a través de la placa correctora esférica 602; y
4. finalmente forma tres (3) imágenes distintas cerca de un plano de imagen 605.

Obsérvese que los rayos que atraviesan el objetivo de microscopio compuesto 60 representado en la figura 9A son casi ópticamente uniformes y esa luz emitida cerca del centro de la cubeta 603 atraviesa la placa correctora 602 con una incidencia casi normal. Por consiguiente, el objetivo de microscopio compuesto 60 introduce muy poca dispersión cromática en la luz emitida cerca del centro de la cubeta 603.

Además, es bien sabido en la comunidad de astrofísica que la cámara Schmidt ofrece la combinación incomparable de una relación focal rápida y un gran campo de visión con un rendimiento óptico limitado de difracción cercana. El principal inconveniente de una cámara Schmidt convencional es que la superficie de imagen se encuentra dentro del instrumento. Para el objetivo de microscopio compuesto 60, la luz cerca del centro de la cubeta 603 se propaga de manera opuesta a la de una cámara Schmidt convencional y, por lo tanto, la superficie de imagen se encuentra fuera del objetivo de microscopio compuesto 60. Por consiguiente, la presente invención aprovecha al máximo el rendimiento óptico de la cámara Schmidt sin experimentar su limitación. Las figuras 9B1 a 9B3 representan diagramas de puntos cerca del plano de imagen 605 para tres (3) ubicaciones de emisión en la zona de visualización dentro del canal de flujo 604 que están separadas 150 micrómetros entre sí. Los diámetros de todas las imágenes representadas en las figuras 9B1 a 9B3 son inferiores a 35 micrómetros.

La luz emitida desde la zona de visualización dentro del canal de flujo 604 del objetivo de microscopio compuesto 60 representado en las figuras 8 y 9A que atraviesa la placa correctora esférica 602 sufre una pequeña cantidad de aberración cromática. La figura 10 representa una realización alternativa para el objetivo de microscopio compuesto 60 representado en las figuras 1, 5A, 5B y 7 de acuerdo con la presente divulgación. Esos elementos representados en la figura 10 que son comunes al objetivo de microscopio compuesto 60 ilustrado en las figuras 8 y 9A llevan el mismo número de referencia distinguido por una designación prima ('). Las formas del espejo de superficie posterior 601' y la placa correctora de aberraciones 602' representadas en la figura 10 se modifican ligeramente para producir

imágenes afocales colimadas de las ubicaciones de emisión cerca de la zona de visualización dentro del canal de flujo 604'. En la figura 10, el objetivo de microscopio compuesto 60' también incluye una lente doblete de compensación cromática 609 insertada entre la placa correctora 602' y el plano de imagen 605'. Además de enfocar la luz emitida desde la placa correctora 602' sobre el plano de imagen 605', la lente doblete 609 también sirve para reducir adicionalmente la aberración cromática residual introducida por la placa correctora esférica 602'.

No es esencial que la superficie plana de la placa correctora 602 se acople ópticamente a la cubeta 603. La figura 11 representa una realización alternativa del objetivo de microscopio compuesto 60 de la presente invención. Esos elementos representados en la figura 11 que son comunes al objetivo de microscopio compuesto 60 ilustrado en las figuras 8 y 9A llevan el mismo número de referencia distinguido por una designación de doble prima ("). La figura 11 representa la placa correctora de aberraciones 602" ópticamente desacoplada de la cubeta 603". Aunque no es esencial para el funcionamiento del objetivo de microscopio compuesto 60", para mejorar la eficiencia de transmisión de luz, ambas superficies de la placa correctora 602" y la superficie plana expuesta de la cubeta 603" pueden llevar un revestimiento antirreflectante. Se entiende que la placa correctora 602" mostrada en la figura 11 se mantiene en relación fija con el espejo de superficie posterior 601 y la cubeta 603 combinados mediante un soporte mecánico no representado en la figura 11. Similar al objetivo de microscopio compuesto 60 y 60' representado respectivamente en las figuras 9A y 10, el objetivo de microscopio compuesto 60" con la placa correctora separada 602" puede configurarse para proporcionar una imagen de longitud focal finita o un sistema afocal que a su vez se enfoca a un plano de imagen de distancia finita mediante la adición de la lente doblete de compensación cromática 609.

La figura 12 representa otra realización alternativa más del objetivo de microscopio compuesto 60. Esos elementos representados en la figura 12 que son comunes al objetivo de microscopio compuesto 60 ilustrado en las figuras 8, 9A y 11 llevan el mismo número de referencia que se distingue por una designación de triple prima ("""). El objetivo de microscopio compuesto 60"" representado en la figura 12 está adaptado para recoger la emisión de dispersión y fluorescencia de las células u otras partículas microscópicas transportadas en la corriente en chorro 519 emitida por la boquilla 518. El objetivo de microscopio compuesto 60"" consiste en un espejo cóncavo de superficie frontal 610 de forma esférica y una placa correctora de aberraciones 612. El espejo de superficie frontal 610 puede estar hecho de vidrio u otros tipos de material duro con un revestimiento altamente reflectante en la superficie cóncava 611 o hecho de metal con superficie cóncava pulida 611. Similar a la placa correctora 602, la placa correctora plano-aféfrica 612 está hecha de una pieza delgada de material transparente, tales como vidrio o plásticos de calidad óptica. La superficie aféfrica puede formarse en cualquier lado de la placa correctora 612. Preferentemente, ambas superficies de la placa correctora 612 están recubiertas con un revestimiento antirreflectante para reducir la pérdida de transmisión óptica, aunque dicho revestimiento no es un requisito obligatorio para una placa correctora 612 de acuerdo con la presente divulgación. Se entiende que el espejo de superficie frontal 610 y la placa correctora 612 se mantienen en relación fija entre sí mediante un soporte mecánico no representado en la figura 12. La luz de dispersión y fluorescencia emitida por las células u otros tipos de partículas microscópicas en la zona de visualización dentro de la corriente en chorro 519 se refleja por la superficie cóncava 611 del espejo de superficie frontal 610. La aberración debida a la reflexión desde la superficie cóncava 611 es corregida por la placa correctora 612 después de que la luz atraviese la placa correctora 612. Los expertos en la materia entienden que el objetivo de microscopio compuesto 60"" puede configurarse para proporcionar una imagen enfocada finita similar a la representada en la figura 9A, o una imagen afocal colimada que está enfocada a una distancia finita del objetivo de microscopio compuesto 60"" mediante un doblete de corrección de aberración cromática similar a la lente doblete 609 representada en la figura 10.

La figura 13 representa una adaptación del objetivo de microscopio compuesto 60 para obtener imágenes de especímenes fijados a la superficie de un sustrato transparente tal como un portaobjetos de vidrio, esta realización no es parte de la presente invención. Esos elementos representados en la figura 13 que son comunes al objetivo de microscopio compuesto 60 ilustrado en las figuras 8, 9A y 11 llevan el mismo número de referencia distinguido por una designación cuádruple prima ("""). El objetivo de microscopio compuesto 60"" representado en la figura 13 incluye dos (2) elementos ópticos, uno, un espejo de superficie posterior plano cóncavo 617 hecho de un material transparente tal como vidrio o plásticos de calidad óptica, y una placa correctora de aberraciones 618. Como se representa en la figura 13, la muestra de la que se va a obtener la imagen se fija a una superficie frontal 615 de un material transparente, normalmente portaobjetos de vidrio 616. El portaobjetos 616 está acoplado ópticamente, preferentemente usando una capa delgada de fluido de coincidencia de índice, a la superficie plana del espejo de superficie posterior 617. La luz de dispersión y fluorescencia emitida por la muestra:

1. se propaga inicialmente a través del portaobjetos 616 y el espejo de superficie posterior 617;
2. se refleja internamente por el espejo de superficie posterior 617 de vuelta a través del portaobjetos 616;
3. luego a través de la placa correctora 618; y
4. finalmente forma una imagen en un plano de imagen que está ubicado más allá de la placa correctora 618.

Subsistema fluídico 70

La figura 15 representa un subsistema fluídico 70 de acuerdo con la presente divulgación que incluye un depósito de líquido envolvente 702 y una bomba de líquido 701 que extrae líquido envolvente del depósito de líquido envolvente 702. La bomba de líquido 701 puede ser una bomba de diafragma, o una bomba peristáltica, o una bomba de pistón o cualquier tipo de bomba de fluido continuo. Una salida de la bomba de líquido 701 se conecta a una entrada de un

acoplamiento en T 703 que recibe líquido envolvente de la bomba de líquido 701. El acoplamiento en T 703 tiene dos (2) salidas, una de las cuales se conecta a un conducto de derivación 710 para devolver una fracción del líquido envolvente recibido por el acoplamiento en T 703 desde la bomba de líquido 701 de vuelta al depósito de líquido envolvente 702. Devolver una fracción del líquido envolvente recibido por el acoplamiento en T 703 desde la bomba de líquido 701 de vuelta al depósito de líquido envolvente 702 es ventajoso por dos (2) razones.

1. Como se representa en la figura 1, el conducto de derivación 710 se deja abierto a la atmósfera circundante, lo que amortigua eficazmente la pulsación para reducir significativamente de este modo la pulsación inherente al funcionamiento de la bomba de líquido 701.

2. Devolver una fracción del líquido envolvente recibido por el acoplamiento en T 703 desde la bomba de líquido 701 de vuelta al depósito de líquido envolvente 702 también reduce eficazmente el rendimiento de la bomba de líquido 701, lo que permite el uso de bombas de bajo coste y caudal comparativamente alto en el citómetro de flujo 40.

Se indica la resistencia al flujo del conducto de derivación 710 como "r" y la resistencia al flujo de la trayectoria desde el acoplamiento en T 703 al canal de flujo 604 de la cubeta 603 como "R". La resistencia de salida a la bomba envolvente es entonces

$$R_p = \frac{rR}{r+R} \quad (1)$$

Ya que $R \gg r$, por lo tanto, el comportamiento de la bomba de líquido 701 está dominado por la resistencia del conducto de derivación 710 cuyas propiedades dinámicas de fluido son insensibles a la temperatura. Por tanto, la configuración del subsistema fluido 70 representado en la figura 15 también proporciona un mecanismo simple para lograr un flujo de líquido envolvente insensible a la temperatura al canal de flujo 604.

Como se representa en la figura 15, una segunda salida del acoplamiento en T 703 se conecta al canal de flujo 604 que se extiende a través de la cubeta 603 preferentemente primero a través de una pequeña cápsula de depósito 704 y luego a través de un cartucho de filtro 705. Como se representa en la figura 16, una pieza de tubo 704' de aproximadamente 1,2 metros (4 pies) de largo puede sustituirse por la cápsula de depósito pequeña 704. Durante la inicialización del subsistema fluido 70, algo de aire queda atrapado en el cartucho de filtro 705 cerca de su entrada que, como se representa en la figura 15, está ubicada por encima de una salida del cartucho de filtro 705. El aire atrapado en el cartucho de filtro 705 actúa como un condensador fluido adicional que reduce eficazmente a un nivel insignificante la pulsación en el líquido envolvente emitido en el canal de flujo 604. Debido a la gran resistencia fluida en el canal de flujo 604, el aire atrapado dentro del cartucho de filtro 705 se comprime. Cuando la bomba de líquido 701 se apaga, el aire atrapado en el cartucho de filtro 705 se empuja hacia el acoplamiento en T 703 de manera análoga a un condensador de descarga. Sin la cápsula de depósito pequeña 704, algo de aire expulsado del cartucho de filtro 705 alcanza el conducto de derivación 710 debido a su baja resistencia fluida, y será empujado fuera del subsistema fluido 70 una vez que la bomba de líquido 701 se enciende de nuevo. Sin suministro de aire adicional, tal escenario se repetirá hasta que la mayor parte del aire se purgue del subsistema fluido 70 haciendo que el cartucho de filtro 705 pierda su eficacia como amortiguador de pulsaciones. Por lo tanto, el propósito de la cápsula de depósito pequeña 704 o la pieza de tubería 704' es proporcionar un depósito para aislar el cartucho de filtro 705 del conducto de derivación 710 asegurando que el aire atrapado dentro del cartucho de filtro 705 permanezca dentro del subsistema fluido 70 a pesar de operaciones repetidas de apagado-encendido de la bomba de líquido 701.

El efecto de amortiguación de pulsaciones del aire atrapado cerca de la entrada del cartucho de filtro 705 es claramente evidente en los histogramas representados en la figura 16A y 16B. La figura 16A representa tiempos de vuelo de partículas medidos en el canal de flujo 604 cuando una bolsa de aire queda atrapada cerca de la entrada del cartucho de filtro 705. La figura 16B representa tiempos de vuelo de partículas medidos en el canal de flujo 604 cuando el aire atrapado se purga del subsistema fluido 70. El resultado representado en los histogramas de las figuras 16A y 16B se hace usando dos (2) haces láser en forma de filo de cuchilla enfocados cerca del centro del canal de flujo 604 que están separados aproximadamente 200 micrómetros. El eje horizontal de las figuras 16A y 16B es el tiempo de vuelo que toma una partícula de un haz láser al otro medido registrando el tiempo de llegada pico de la luz dispersa desde la partícula a noventa grados (90°) desde los haces de excitación. En ambos casos, el tiempo de vuelo promedio para que las partículas crucen los dos haces láser es el mismo. Como se muestra en la figura 16A, cuando el cartucho de filtro 705 retiene algo de aire, todas las partículas tardan aproximadamente la misma cantidad de tiempo en cruzar los dos haces láser. Si el cartucho de filtro 705 no retiene aire, como se muestra en la figura 16B, la distribución de los tiempos de vuelo no solo se amplía, sino que también se vuelve bimodal. En otras palabras, algunas partículas tardan menos tiempo, mientras que otras tardan más que la cantidad de tiempo promedio en cruzar los dos haces láser, un fenómeno que se puede atribuir fácilmente a la pulsación de la velocidad del líquido envolvente en el canal de flujo 604.

En las realizaciones de la presente divulgación analizadas hasta ahora, la resistencia fluida a lo largo del conducto de derivación 710, así como entre el acoplamiento en T 703 y el canal de flujo 604, no es ajustable. Como debería ser evidente para los expertos ordinarios en la materia, unos restrictores de flujo tales como un restrictor fijo o válvulas

ajustables 711, 711' y 712, 712' pueden insertarse ventajosamente en el conducto de derivación 710 y entre el acoplamiento en T 703 y el canal de flujo 604 para permitir ajustar el caudal a través del canal de flujo 604. Alternativamente, la velocidad del líquido envolvente que fluye a través del canal de flujo 604 también se puede ajustar usando una bomba de líquido 701 que es accionada por un motor de CC sin escobillas de velocidad variable.

5

Bomba peristáltica 80

Una realización de una bomba peristáltica 80 de acuerdo con la presente divulgación aparece en la figura 17. La bomba incluye una carcasa 809 con una pista curvada arqueada 808, tres rodillos 810, 811 y 812 unidos a un rotor 816 giratorio dentro de la carcasa 809, y un tubo compresible 807 intercalado entre el tubo compresible 807 de la carcasa 809 y los rodillos 810, 811 y 812. Como se representa esquemáticamente en las figuras 18A a 18D, los rodillos 810, 811 y 812 de la bomba peristáltica 80 están separados a distancias angulares, separaciones o espaciamentos sustancialmente iguales entre sí alrededor del perímetro del rotor 816. Por simplicidad, se supone en las siguientes discusiones que el rotor 816 gira en sentido antihorario, aunque debe entenderse que las discusiones se aplican igualmente bien a una bomba peristáltica con rotor giratorio en el sentido horario. El tubo compresible 807 de la carcasa 809 puede dividirse en varias secciones:

1. una sección abierta entre el punto 801 y el punto 806 donde no experimenta compresión;
2. una sección de entrada de bomba entre el punto 801 y el punto 802 donde se comprime progresivamente hasta que se cierra completamente cuando un rodillo rueda sobre la sección;
3. dos secciones de bombeo entre el punto 802 y el punto 803, así como entre el punto 804 y el punto 805 en donde está completamente cerrado por el rodillo;
4. una sección de rebaje entre el punto 803 y el punto 804 en la que se expande progresivamente desde cierre completo hasta apertura completa a medida que un rodillo rueda a través de la parte de expansión de la sección de rebaje desde el punto 803 hasta el punto 813;
5. a continuación, se comprime progresivamente hasta cerrarse completamente a medida que un rodillo rueda a través de una parte de compresión de la sección de rebaje desde el punto 813 hasta el punto 804; y
6. la sección de salida entre el punto 805 y el punto 806 donde se expande progresivamente desde cierre completo hasta apertura completa a medida que un rodillo rueda a través de la sección.

30

En otras palabras, cuando un rodillo rueda en sentido antihorario sobre el punto de entrada 801 al punto de salida 806, el hueco interior

1. disminuye progresivamente desde completamente abierto en el punto 801, a completamente cerrado en el punto 802 y permanece cerrado hasta el punto 803;
2. luego se expande progresivamente de nuevo para abrirse completamente en el punto 813;
3. luego disminuye progresivamente hasta completamente cerrado en el punto 804, y permanece cerrado hasta que el rodillo alcanza el punto 805; y
4. finalmente se expande progresivamente de nuevo hasta completamente abierto en el punto 806.

40

El tamaño del hueco dentro se ilustra esquemáticamente en las figuras 18A a 18D como la separación entre el círculo discontinuo y el tubo compresible sólido 807. Como se ilustra en las figuras 18A a 18D, en esta realización de la bomba peristáltica 80 las distancias angulares, separaciones o espacios entre los puntos 801 y 803, los puntos 802 y 813, los puntos 813 y 805, así como entre los puntos 804 y 866 son idénticos al ángulo entre rodillos adyacentes. Como resultado, cuando el rodillo 810 rueda a través de la sección de bombeo desde el punto 804 hasta el punto 805, como se representa en las figuras 18A a 18B, su interacción con este determina completamente el caudal de fluido de la bomba peristáltica 80. Una vez que el rodillo 810 alcanza la sección de salida entre los puntos 805 y 806, como se muestra en la figura 18C, debajo del rodillo 810 comienza a expandirse progresivamente y comienza a crecer un hueco. Mientras tanto, el rodillo 811 llega a la parte de compresión de la sección de rebaje y comienza a comprimir progresivamente el. En la bomba peristáltica 80, la forma de la parte de compresión de la sección de rebaje entre el punto 813 y el punto 804 a lo largo del tubo compresible 807 es tal que el volumen de líquido expulsado por la compresión del rodillo inferior 811 en la parte de compresión de la sección de rebaje entre el punto 813 y el punto 804 llena sustancialmente el volumen creado por la expansión debajo del rodillo 810 en la sección de salida entre el punto 5 y el punto 6. Durante este periodo, el compresible está parcialmente abierto por debajo de ambos rodillos 810 y 811 y completamente cerrado por debajo del rodillo 12. Por consiguiente, la acción de bombeo se suministra principalmente por el rodillo 12. En concreto, dado que, por diseño, el volumen total de líquido en la sección entre el punto 13 y el punto 6 permanece sustancialmente constante durante este período, el caudal de la bomba peristáltica 80 en el estado mostrado en la figura 18C permanece sustancialmente igual que en el estado mostrado en las figuras 18A y 18B. Una vez que el rodillo 810 pasa el punto 806, el rodillo 811 alcanza la sección de bombeo entre el punto 804 y el punto 805. Obsérvese que no hay diferencia física entre los rodillos 810, 811 y 812, por lo tanto, el caudal de la bomba peristáltica 80 permanece sustancialmente constante durante todo el proceso.

El mecanismo de la bomba peristáltica sin pulsos de la presente divulgación puede entenderse más claramente si se ve a lo largo de una coordenada circular que sigue el movimiento de los rodillos. Haciendo referencia a la figura 19, se indica como V el volumen del fluido dentro de un tubo compresible 819 desde la salida hasta un rodillo más cercano 820 que cierra el tubo compresible 819, es decir, la cantidad de fluido representada por el área sombreada 818 área

65

sombreada 818 que se muestra en la figura 19. Claramente, V depende de la posición angular, θ , del rodillo 20, así como δ , la cantidad de compresión del tubo ejercida por todos los demás rodillos aguas abajo.

$$V = V(\theta, \delta_1, \delta_2, \dots) \quad (1)$$

5

Por consiguiente, el caudal, F, de una bomba peristáltica está relacionado con la derivada del tiempo de V_c por:

$$-F = \frac{dV}{dt} = \frac{\partial V}{\partial \theta} R + \sum_i \frac{\partial V}{\partial \delta_i} \frac{d\delta_i}{dt} \quad (2)$$

10 En este caso, R es la velocidad de rotación del rotor y los subíndices se usan para identificar múltiples rodillos aguas abajo. El primer término en el lado derecho de la Ec. (2) representa la contribución del rodillo que cierra el tubo. La

derivada parcial $\frac{\partial V}{\partial \theta}$ es por lo tanto independiente de θ . El término de suma representa las contribuciones de todos los demás rodillos aguas abajo que comprimen parcialmente el tubo compresible 819. Ahora ΔS es el cambio de área de sección transversal debido a la compresión del tubo compresible 819 por el, y L la longitud del tubo donde su forma de sección transversal se ve afectada por la compresión del tubo. A continuación, es obvio para un experto en la materia que L es proporcional a la compresión del tubo δ , y ΔS proporcional a su cuadrado, δ^2 . Por consiguiente, ΔV , el volumen de fluido perdido debido a la compresión del tubo por el rodillo, sigue la Ec. (3):

15

$$\Delta V \propto L \cdot \Delta S \propto \delta^3 = (D - G)^3 \quad (3)$$

20

donde D es el diámetro interior del tubo compresible y G el hueco mínimo indicado en las figuras 19, 19A y 19B que también se representa en las figuras 18A a 18D por el espacio entre el círculo discontinuo y el tubo compresible sólido 807 de la carcasa 809. Haciendo referencia ahora a las figuras 20A y 20B, en el sistema de coordenadas circular, la figura 20A corresponde al estado de la bomba mostrado en las figuras 18A y 18B. Durante este periodo, no hay ningún rodillo aguas abajo del rodillo 810' y el término de suma en la Ec. (2) desaparece. La figura 20B corresponde al estado de la bomba mostrado en la figura 18C. Se cierra por el rodillo 12' y se comprime parcialmente por los rodillos 810' y 811'. Sin embargo, los cambios volumétricos introducidos por los dos rodillos 810' y 811' se cancelan sustancialmente entre sí. Por consiguiente, el término de suma es Ec.(2) también desaparece. Como resultado, el caudal de la bomba peristáltica 80 permanece sustancialmente constante independientemente de las posiciones de los rodillos.

25

30

La forma del tubo compresible 807 que satisface el requisito anterior puede derivarse fácilmente de la Ec. (3). Haciendo referencia a la figura 18C, si los huecos del tubo compresible arqueado 807 en la parte de compresión de la sección de rebaje entre el punto 813 y el punto 804, $G_{13,4}$, y en la sección de salida entre el punto 805 y el punto 806, $G_{5,6}$,

35

$$(D - G_{13,4})^3 + (D - G_{5,6})^3 = D^3 \quad (4)$$

entonces el volumen de fluido total en las dos secciones permanece sustancialmente constante, como se muestra en la figura 21. En la bomba peristáltica 80, la forma de la carcasa de bomba 809 es simétrica con respecto a su línea central, de modo que la mitad de entrada de la carcasa de bomba 809 sea la imagen especular de la mitad de salida de la carcasa 809, como se muestra en la figura 17. Por lo tanto, la bomba peristáltica 80 puede funcionar tanto en rotación en sentido antihorario como en sentido horario con muy poca pulsación, aunque se entiende que no se requiere la simetría para realizar una bomba peristáltica sin pulsos de acuerdo con la presente divulgación. Por ejemplo, siempre que los huecos del tubo compresible arqueado 807 en la sección entre el punto 13 y el punto 3, $G_{13,3}$, y en la sección entre el punto 2 y el punto 1, $G_{2,1}$, sigan la Ec. (5),

40

45

$$(D - G_{13,3})^3 + (D - G_{2,1})^3 = D^3 \quad (5)$$

una bomba peristáltica de acuerdo con la presente divulgación exhibirá poca pulsación cuando el rotor 816 gire en el sentido horario.

50

La figura 22 representa una realización alternativa de una bomba peristáltica de acuerdo con la presente divulgación. Esos elementos representados en la figura 22 que son comunes a la bomba peristáltica 80 ilustrada en la figura 17 llevan el mismo número de referencia distinguido por una designación prima ('). La bomba peristáltica 80' incluye un tubo compresible 807' que tiene dos (2) rebajes 820 y 821, y cuatro (4) rodillos 822, 823, 824 y 825. En la realización que se representa en la figura 22, la pérdida de volumen de fluido debida a la expansión del tubo cerca de la salida de la bomba se compensa por el efecto combinado de la compresión del tubo compresible por los rodillos 822 y 823 cerca de los dos rebajes 820 y 821.

55

La figura 23 representa otra realización alternativa más de una bomba peristáltica de acuerdo con la presente divulgación. Esos elementos representados en la figura 23 que son comunes a la bomba peristáltica 80 ilustrada en la figura 17 y la bomba peristáltica 80' ilustrada en la figura 22 llevan el mismo número de referencia distinguido por una designación de doble prima ("'). La bomba peristáltica 80'' incluye seis (6) rodillos y un tubo compresible arqueado 807'' que tiene dos rebajes 818'' y 819''. En la bomba peristáltica 80'', la pérdida de volumen de fluido debida a la expansión del tubo cerca de la salida de la bomba se compensa por la acción del rodillo inmediatamente aguas arriba del rebaje 818'' u 819'' cerca de la salida de la bomba.

La pulsación debida a la expansión de un tubo compresible comprimido cerca de la salida de una bomba peristáltica también puede superarse mediante una bomba peristáltica que tenga una velocidad de rotor programable. Las figuras 24A a 24C ilustran aspectos pertinentes de un mecanismo de realización alternativo para minimizar la pulsación de la bomba peristáltica de acuerdo con la presente divulgación para una bomba peristáltica de 3 rodillos. Como se representa en la figura 24B, la pista 828 es sustancialmente circular entre la entrada de la bomba y la sección de salida de la bomba. Por consiguiente, como se indica por el espacio entre el círculo discontinuo 829 y la curva continua de la pista 828, el tubo compresible está completamente cerrado por varios de los tres (3) rodillos 826, 827 y 829 de la bomba entre la entrada de la bomba y la salida de la bomba. La figura 24A ilustra esquemáticamente en un sistema de coordenadas circular las posiciones de rodillo para la bomba peristáltica representada en la figura 24B. Dado que solo hay un rodillo aguas abajo del que cierra el tubo, la Ec. (2) se simplifica mucho:

$$-F = R \left(\frac{\partial V_c}{\partial \theta} + \frac{\partial V_c}{\partial \delta} \frac{d\delta}{d\theta} \right) \quad (6)$$

Aquí la compresión del tubo $\delta(\theta)$ se expresa explícitamente como una función de la posición del rodillo θ . Los términos dentro de los paréntesis representan la tasa de cambio del volumen de fluido con respecto a la posición del rodillo. El primer término es la contribución del rodillo que cierra el tubo, es decir, el rodillo 827 de la figura 24A, y el segundo término la contribución del rodillo en la sección de salida. Téngase en cuenta que, por definición, la tasa de cambio de volumen es negativa y el segundo término dentro de los paréntesis desaparece cuando no hay rodillo en la sección de salida. La curva de puntos en la figura 24C es un gráfico representativo de la tasa de cambio de volumen negativo con respecto a la posición del rodillo. La protuberancia a lo largo de la curva, debido a la expansión del tubo cuando un rodillo rueda fuera del tubo cerca de la salida de la bomba, es la causa de la pulsación en las bombas peristálticas convencionales que tienen una velocidad de rotor constante. Sin embargo, para la bomba peristáltica representada en las figuras 24A a 24C, la velocidad del rotor, R, mostrada como curva discontinua en la figura 24C, se establece para variar en sincronismo con la posición del rotor e inversamente proporcional a la tasa de cambio del volumen de fluido. Por consiguiente, el caudal de la bomba, que es el producto de la velocidad del rotor y la tasa de cambio del volumen de fluido, permanece constante, como se indica por la línea continua en la parte superior de la figura 24C. Obsérvese que los términos dentro de los paréntesis de la Ec. (6) están determinados únicamente por la estructura mecánica de la bomba. Por lo tanto, el perfil de velocidad del rotor puede generarse fácilmente a partir de la forma de la pista 828 de acuerdo con la Ec. (3). Para los expertos en la materia, hay muchas formas de realizar un rotor programable, por ejemplo, con motor paso a paso o servomotor de CC.

Dispositivo WDM 90

La figura 25 muestra la traza de rayos ópticos para un multiplexor por división de longitud de onda de 6 puertos ilustrativo de la presente divulgación que usa una configuración en zigzag. Como se muestra en la figura 25, la luz de fluorescencia que atraviesa un agujero estenopeico o se emite desde la faceta de una fibra óptica multimodo, tal como la fibra óptica 852 representada en la figura 1, forma un objeto extendido o fuente de luz en la ubicación 901, es decir, la entrada óptica del WDM 90. El tamaño del objeto se define por el diámetro del agujero estenopeico o el diámetro del núcleo de la fibra óptica multimodo. Obsérvese que el tamaño práctico del agujero estenopeico o el diámetro del núcleo de la fibra óptica multimodo se mide en milímetros, en contraste con el diámetro de las fibras ópticas monomodo que se mide en micrómetros. Por consiguiente, la extensión de la fuente de luz de fluorescencia, definida como el producto del tamaño del haz y su ángulo de divergencia, es cientos de veces mayor que su contraparte en comunicación óptica. De acuerdo con el teorema de la conservación de extensión (Julio Chaves, Introduction to Nonimaging Optics, CRC Press, 2008 [ISBN 978-1420054293]), la luz de una fuente tan extendida, similar a la de una luz de flash, solo se puede mantener colimada durante una distancia muy limitada, particularmente cuando el diámetro de la porción colimada necesita ser pequeño.

Como se representa en la figura 25, un elemento óptico de colimación, en este caso, una lente doblete acromática 902, captura la luz de la fuente 901 y proyecta una imagen ampliada del objeto cerca de una lente de enfoque final 905. El tamaño de la imagen cerca de 905 se mantiene aproximadamente igual que el tamaño efectivo del elemento óptico de colimación 902. Por consiguiente, el haz de luz que se propaga entre la lente 902 y la lente 905 se colima eficazmente. Como se muestra en la figura 25, siempre que el factor de aumento se mantenga pequeño, por ejemplo, menos de aproximadamente 10, usando una lente simple 905, el haz de luz colimado puede enfocarse fácilmente hacia abajo a un punto más pequeño que el del haz de luz recibido por el WDM 90 en la ubicación 901. La capacidad de enfocar el haz de luz hasta un tamaño tan pequeño permite colocar un detector de semiconductores de

área pequeña en un punto focal 906 de la lente de enfoque 905 para una fotodetección eficiente.

Un filtro dicroico 903, orientado en un ángulo inclinado, se inserta en la trayectoria óptica aproximadamente a mitad de camino entre el elemento óptico de colimación 902 y la lente 905. El filtro dicroico 903 pasa la banda de color de interés y refleja los colores restantes en el haz de luz para procesamiento adicional dentro del WDM 90. Un filtro de paso de banda opcional 904 puede insertarse después del filtro dicroico 903 para mejorar adicionalmente la capacidad de aislamiento de color del WDM 90.

La luz reflejada desde el filtro dicroico 903 incide sobre un segundo elemento óptico 907, preferentemente un espejo cóncavo. El espejo cóncavo 907 tiene un radio de curvatura aproximadamente igual a la distancia entre el elemento óptico de colimación 902 y la imagen cerca de la lente de enfoque 905. Por lo tanto, el espejo cóncavo 907 crea una segunda imagen de la lente de colimación 902 cerca de una segunda lente de enfoque 908. El haz de luz entre el espejo cóncavo 907 y la segunda imagen en la lente 908 tiene sustancialmente el mismo diámetro que el haz de luz entre la lente de colimación 902 y la primera imagen cerca de la lente de enfoque 905. El espejo cóncavo de formación de imágenes de retransmisión 907, por lo tanto, duplica eficazmente la trayectoria del haz colimado sin expandir el diámetro del haz. De nuevo, el haz extendido pero colimado se puede enfocar fácilmente hacia abajo a un punto más pequeño que el de la fuente de luz en 901. A continuación, se inserta un segundo filtro dicroico 909 aproximadamente a mitad de camino entre el espejo cóncavo de formación de imágenes de retransmisión 790 y la segunda imagen cerca de la lente de enfoque 908. El segundo filtro dicroico 909 pasa otra banda de color en el haz de luz recibido por el WDM 90 en la ubicación 901 y refleja el resto del haz de luz incidente para procesamiento adicional.

Como se muestra en la figura 25, los elementos ópticos de colimación de retransmisión adicionales 910, 911, 912, 913 y los filtros dicroicos 914, 915, 916, 917 se pueden conectar en cascada de la misma manera para producir múltiples imágenes cerca de las lentes de enfoque 918, 919, 920 y 921, correspondiendo cada una de estas imágenes a una banda de luz de color específica recibida por el WDM 90 en la ubicación 1. Como se muestra en la figura 25, debido a la arquitectura de retransmisión de formación de imágenes 1:1 de la presente divulgación, los puntos de luz producidos por las lentes de enfoque 906, 908, 918, 919, 920 y 921 son todos más pequeños que la fuente del haz de luz y, por lo tanto, pueden capturarse fácilmente por los APD de área pequeña.

Aunque la figura 25 ilustra un multiplexor por división de longitud de onda de 6 puertos para un haz de luz desde la fuente de luz extendida, es fácilmente evidente para los expertos en la materia que los WDM que tienen diferentes números de puertos se pueden construir fácilmente de acuerdo con la presente divulgación. También es evidente para los expertos en la materia que, aunque el WDM 90 usa preferentemente dobletes acromáticos como el primer elemento óptico de colimación, la lente singlete también se puede usar ya que las imágenes creadas antes de las lentes de enfoque 906, 908, 918, 919, 920 y 921 son todas casi monocromáticas. En lugar de usar espejos cóncavos para retransmitir el haz de luz reflejado desde los filtros dicroicos, también se pueden usar ópticas refractivas como elemento de retransmisión para extender la trayectoria del haz de luz colimado. Una clara ventaja de la arquitectura en zigzag usada en el WDM 90, sin embargo, es la posibilidad de usar detectores de matriz lo que conduciría a un WDM más compacto adecuado para instrumentación portátil.

La figura 26 ilustra un trazado de rayos ópticos para un dispositivo de colimación de la técnica anterior. La técnica representada en la figura 26 se usa ampliamente en instrumentos de fluorescencia multicolor convencionales, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6.683.314. Como se muestra en la figura 26, el haz de luz diverge rápidamente más allá de la imagen 924 creada por el elemento óptico de colimación 923. Por consiguiente, la única opción para construir un dispositivo multicolor es insertar filtros dicroicos entre el elemento de colimación 923 y su imagen 924.

Debido a la restricción de conservación extendida, el diámetro del haz colimado debe expandirse significativamente para aceptar múltiples filtros dicroicos en la sección. El haz expandido crea un serio desafío para reenfocar el haz colimado hacia abajo a pequeños puntos adecuados para detectores de semiconductores de área pequeña. Para superar estas dificultades, algunos fabricantes de instrumentos han optado por usar Mt exclusivamente para la detección de fluorescencia, tal como en los citómetros de flujo de corriente principal fabricados por Becton-Dickinson, Bectman Coulter y Partec y la serie MegaBACE de secuenciadores de ADN de GE Amersham. Otros instrumentos, tales como los analizadores de perlas multiplexadas Luminex, han seleccionado ciertas bandas de color con fluorescencia brillante conocida, y usa APD de área grande para detectar luz en las bandas de color seleccionadas.

La figura 27 ilustra una vista en perspectiva de una realización alternativa para un WDM 90 de 6 puertos usando una combinación de configuraciones en zigzag y ramificada. El diseño es una modificación de la configuración en zigzag representada en la figura 25. En la realización alternativa que se representa en la figura 27, el filtro de paso de banda 904 de la figura 25 se sustituye por un filtro dicroico 904'. El filtro 904' se coloca para dejar pasar un color y refleja otros colores a noventa grados (90°). La longitud de la trayectoria óptica del haz de luz que pasa a través del filtro dicroico 904' y que se refleja desde el 904' es sustancialmente la misma, de manera que un brazo se enfoca por las lentes 905 y el otro por la lente 905' a pequeños puntos compatibles con detectores de semiconductores de área pequeña colocados en la ubicación focal 906 y 906'. Como se muestra en la figura 25, el color restante de la luz reflejada por el filtro dicroico 903 se retransmite mediante un espejo cóncavo 907 y la configuración que incluye los elementos ópticos 903, 904', 905 y 905' se conecta en cascada dos (2) veces más para formar un WDM de 6 puertos.

La figura 28 ilustra una vista en perspectiva de una realización alternativa para un WDM 90 de 8 puertos. Al reemplazar los espejos de formación de imágenes de retransmisión cóncavos 907 y 910 en la figura 27 con filtros dicróicos de forma cóncava 907' y 910', el WDM representado en la figura 28 proporciona 2 bandas de color más en comparación con los WDM representados en las figuras 25 y 27.

A lo largo de los años se han desarrollado numerosas sondas de fluorescencia para su uso en citometría de flujo. Más recientemente, múltiples proteínas de fluorescencia también se han convertido en una herramienta importante en estudios biomédicos. Para acomodar diferentes tipos de sonda de fluorescencia, se han desarrollado diversas técnicas para permitir que el usuario seleccione filtros dicróicos adecuados para sus necesidades particulares. Un desafío importante para los filtros dicróicos reemplazables es evitar el contacto directo de la superficie de filtro recubierta con cualquier marco de referencia de citómetro de flujo duro. El contacto directo repetido entre la superficie de filtro recubierta y cualquier marco de referencia duro puede dañar un filtro dicróico reemplazable. En la actualidad, la mayoría de las soluciones convencionales que abordan este problema usan espaciadores mecánicos mecanizados con precisión para mantener los filtros dicróicos reemplazables en su lugar. Un ejemplo de una solución de este tipo aparece en la patente de Estados Unidos n.º 6.683.314. Sin embargo, dicha solución se vuelve poco fiable si el área activa del detector es menor que 1,0 mm².

Las figuras 29A y 29B representan la fabricación de un conjunto de filtro dicróico reemplazable 934 ilustrado en la figura 29C adecuado para detectores de área pequeña. El montaje del conjunto de filtro dicróico reemplazable 934 comienza en la figura 29A que representa la construcción de una plantilla de referencia para su fabricación. La plantilla de referencia es una escalera hecha de dos (2) placas de vidrio 925 y 926 ópticamente paralelas. La unión de las dos (2) placas de vidrio 925 y 926 juntas en contacto óptico asegura que una superficie 929 de la placa de vidrio 925 se vuelva ópticamente paralela a una superficie 930 de la placa de vidrio 926. A continuación, se presiona una superficie frontal 932 de un filtro dicróico reemplazable 927 contra la superficie 929 de la plantilla. Un portafiltras 928, que se ajusta holgadamente al filtro dicróico 927, incluye una superficie de referencia 931 y una ranura de filtro 933. Durante el montaje del filtro dicróico reemplazable, la ranura de filtro 933 se llena parcialmente con adhesivo epoxi y la superficie de referencia 931 del portafiltras 928 se presiona contra la superficie 930 de la plantilla mientras el portafiltras 928 se desliza hacia el filtro dicróico 927. Mientras el adhesivo epoxi fragua, parte del filtro dicróico 927 permanece asentado dentro de la ranura de filtro 933 mientras se aplica presión contra el filtro dicróico 927 y el portafiltras 928. Debería ser evidente para los expertos en la materia que el adhesivo epoxi puede ser curable por UV o térmicamente, o hacerse mezclando componentes de una mezcla A/B. La figura 29C representa el E934~ fabricado como se representa en las figuras 29A y 29B y se ha descrito anteriormente. El proceso de montaje representado en las figuras 29A y 29B y descrito anteriormente asegura que la superficie frontal 932 del conjunto de filtro dicróico reemplazable 934 será ópticamente paralela a la superficie de referencia 931, y con una muesca con respecto a esta última a una separación determinada con precisión por el espesor de la placa de vidrio 925.

Las figuras 30A y 30B representan una realización de la presente divulgación en la que el conjunto de filtro dicróico reemplazable 934 mencionado anteriormente se usa en el WDM 90 para procesar ópticamente un haz de luz desde una fuente de luz extendida. Una característica notable del WDM 90 es un bloque de referencia de vidrio 935 que tiene una superficie ópticamente plana. Como podrán observar los expertos en la materia, el bloque de referencia de vidrio 935 puede estar hecho de otros materiales. Como se muestra en la figura 30B, cuando se instala un filtro dicróico 927, la superficie de referencia 931 del conjunto de filtro dicróico reemplazable 934 se desliza contra la superficie plana del bloque de referencia de vidrio 935 y se mantiene en contacto con la misma mediante un tornillo accionado por resorte 936. Por consiguiente, la superficie frontal recubierta 932 del conjunto de filtro dicróico reemplazable 934 permanece ópticamente paralela al plano óptico y ubicada con precisión. De momento, la muesca de la superficie frontal 932 con respecto a la superficie de referencia 931 la protege del contacto físico con cualquier objeto durante el reemplazo del filtro.

Es evidente para los expertos en la materia que son posibles muchas modificaciones y variaciones de las realizaciones descritas del conjunto de filtro dicróico reemplazable 934. Por ejemplo, una realización alternativa de la presente divulgación es un pedestal ensamblado usando un primer y un segundo planos ópticos redondos. Al montar el conjunto de filtro dicróico reemplazable 934, la superficie de referencia de un portafiltras descansa contra una superficie del primer plano óptico y la superficie recubierta del filtro dicróico descansa contra la superficie plana del segundo plano óptico. La unión epoxi mantiene la superficie recubierta del filtro dicróico ópticamente paralela a la superficie de referencia de un portafiltras, pero indentada a una distancia determinada con precisión por el espesor del segundo plano óptico.

Aplicabilidad industrial

Aunque se ha descrito con cierto detalle una realización de la presente divulgación de un sistema óptico basado en LD para aplicación de citometría de flujo, y también se han descrito realizaciones igualmente ventajosas para un instrumento de citometría de flujo basado en corriente, será evidente para los expertos en la materia que son posibles muchas modificaciones y variaciones de la realización descrita a la luz de las enseñanzas anteriores sin apartarse de los principios y conceptos de la divulgación como se expone en las reivindicaciones.

5 Aunque se ha descrito con cierto detalle una realización de la presente divulgación de un dispositivo de multiplexación por división de longitud de onda para separar el haz de luz de una fuente de luz extendida en múltiples bandas de color, y también se han descrito varias otras realizaciones igualmente ventajosas, será evidente para los expertos en la materia que son posibles muchas modificaciones y variaciones de las realizaciones descritas a la luz de las enseñanzas anteriores sin apartarse de los principios y conceptos de la divulgación como se expone en las reivindicaciones.

10 Aunque la presente invención se ha descrito en términos de la realización actualmente preferida, debe entenderse que tal divulgación es puramente ilustrativa y no debe interpretarse como limitante. Por consiguiente, sin alejarse del alcance de la divulgación, diversas alteraciones, modificaciones y/o aplicaciones alternativas de la divulgación, sin duda, se sugerirán a los expertos en la materia después de haber leído la divulgación anterior. En consecuencia, se pretende que la presente invención esté definida por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un citómetro de flujo que incluye una celda de flujo y un objetivo de microscopio compuesto (60), comprendiendo el objetivo de microscopio compuesto:
- 5
- un espejo esférico cóncavo (601);
 - una placa de compensación de aberración transparente (602);
 - una zona de visualización que se ubica entre el espejo y la placa de compensación en la celda de flujo;
- 10 en donde
- la luz de dispersión y de fluorescencia emitida por las partículas en la zona de visualización es recogida por el espejo y reflejada hacia la placa de compensación para formar una imagen de la zona de visualización, y
 - las aberraciones ópticas que se originan en el espejo se reducen después de que la luz pase a través de la placa
- 15 de compensación.
2. El citómetro de flujo de la reivindicación 1, en donde la celda de flujo incluye además un canal de flujo (604) dispuesto dentro de una cubeta (603).
- 20 3. El citómetro de flujo de la reivindicación 2, en donde al menos uno del espejo (601) y la placa de compensación (602) está unido a la cubeta (603).
4. El citómetro de flujo de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en donde al menos uno del espejo (601) y la placa de compensación (602) está formado integralmente con la cubeta (603).
- 25 5. El citómetro de flujo de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el espejo (601) y la placa de compensación (602) están dispuestos en lados opuestos de la cubeta (603).
- 30 6. El citómetro de flujo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el espejo (601) es un espejo plano-cóncavo.
7. El citómetro de flujo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la placa de compensación (602) es una lente plano-afélica.
- 35 8. El citómetro de flujo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la placa de compensación (602) incluye una única superficie afélica.
9. El citómetro de flujo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el espejo (601) está configurado para recoger la luz que emana de una pluralidad de ubicaciones espacialmente separadas en la zona de visualización y para reflejar la luz recogida a través de la placa de compensación (602) para formar una correspondiente pluralidad de imágenes cerca de un plano de imagen.
- 40 10. El citómetro de flujo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la placa de compensación (602) tiene una zona neutra ubicada entre una primera zona y una segunda zona, en donde la primera zona tiene potencia óptica negativa, en donde la segunda zona tiene potencia óptica positiva.
- 45 11. El citómetro de flujo de la reivindicación 10, en donde la zona neutra es una zona de forma circular, en donde la primera zona está ubicada fuera de la zona neutra, en donde la segunda zona está ubicada dentro de la zona neutra.
- 50 12. El citómetro de flujo de la reivindicación 1 o cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde la celda de flujo incluye una boquilla (518) configurada para emitir una corriente en chorro (519), en donde la zona de visualización está ubicada dentro de la corriente en chorro.
13. El citómetro de flujo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la luz reflejada por el espejo (601) pasa a través de la placa de compensación (602).
- 55 14. El citómetro de flujo de la reivindicación 13, en donde la luz reflejada por el espejo (601) atraviesa la placa de compensación (602) con una incidencia casi normal.

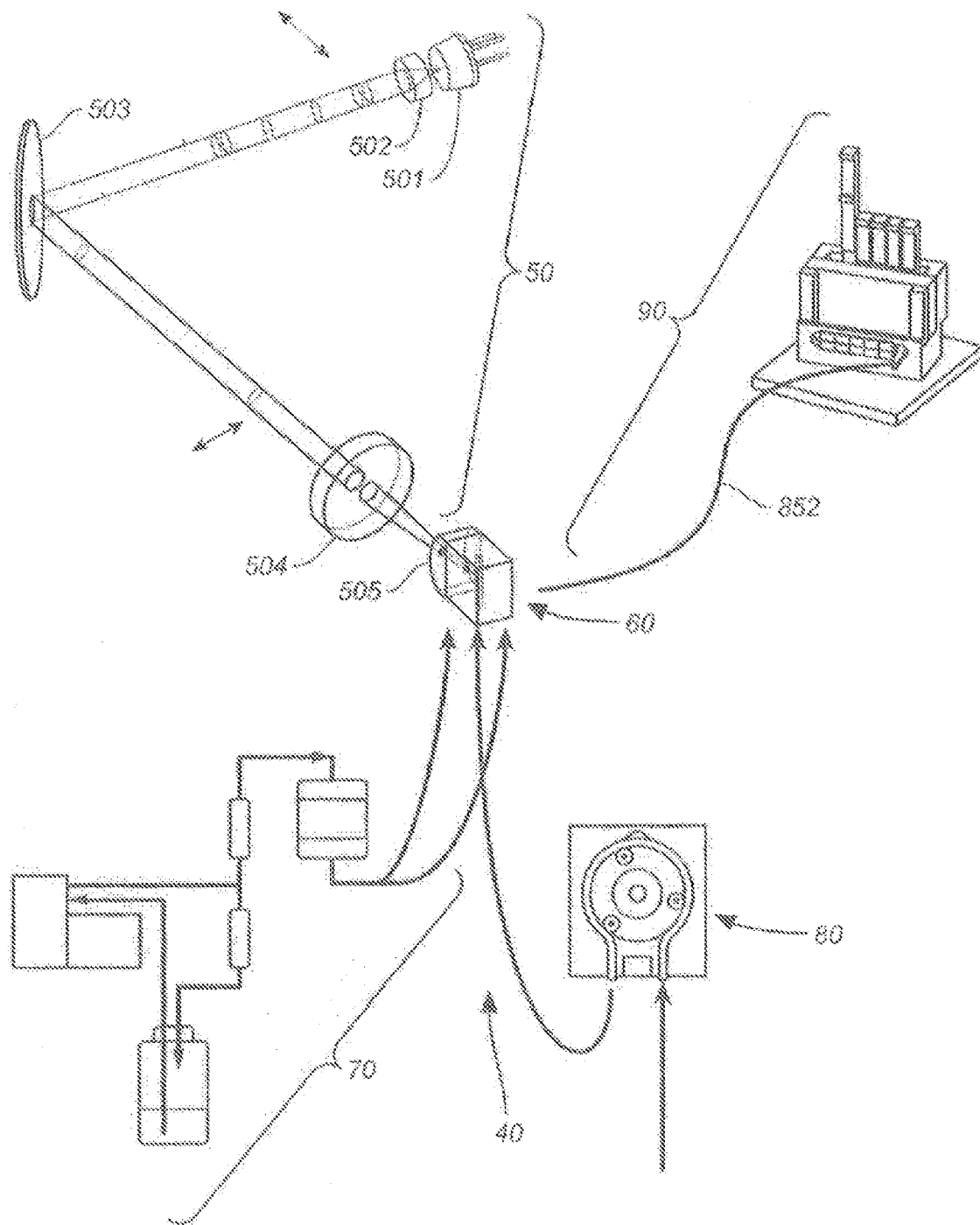


FIG. 1

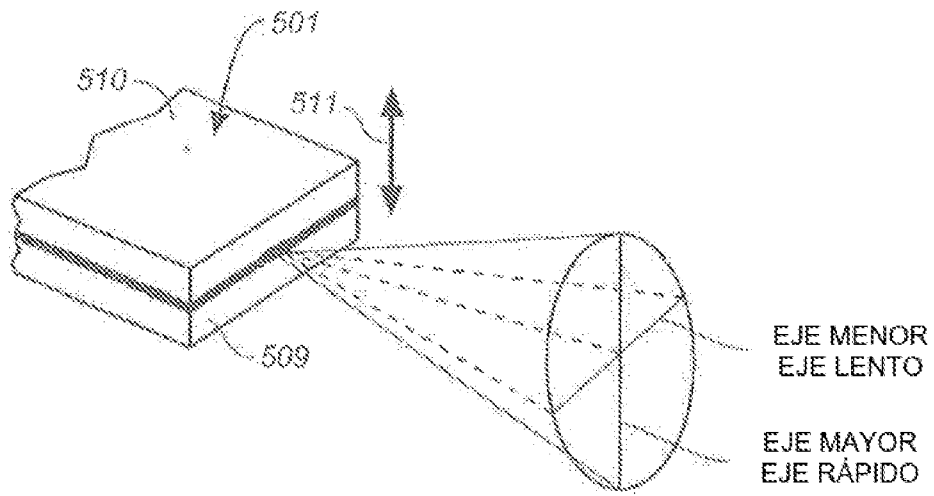


FIG. 2

512

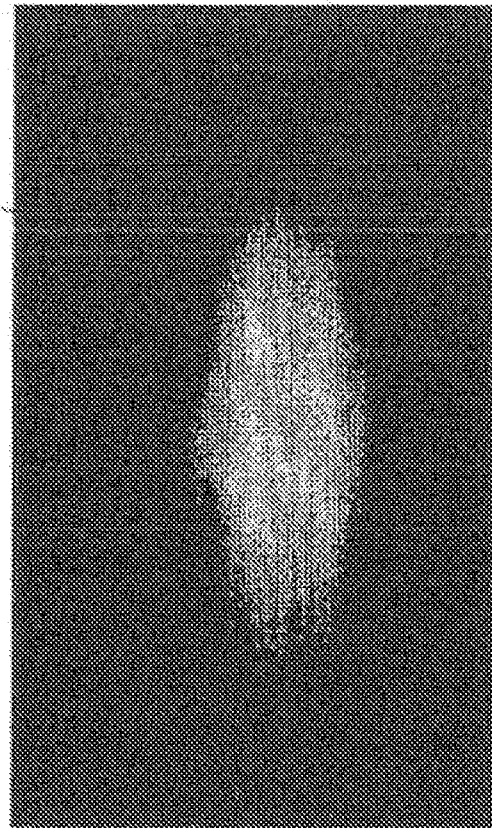


FIG. 2A

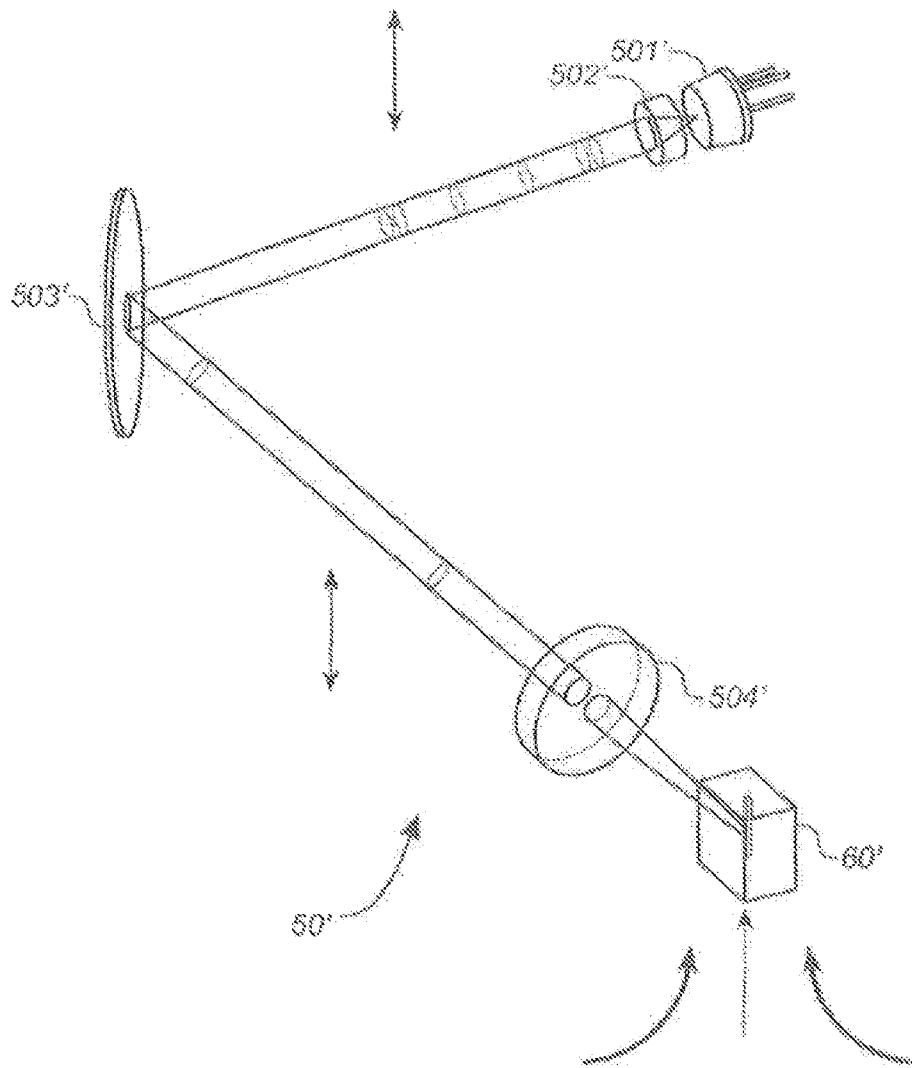


FIG. 3A

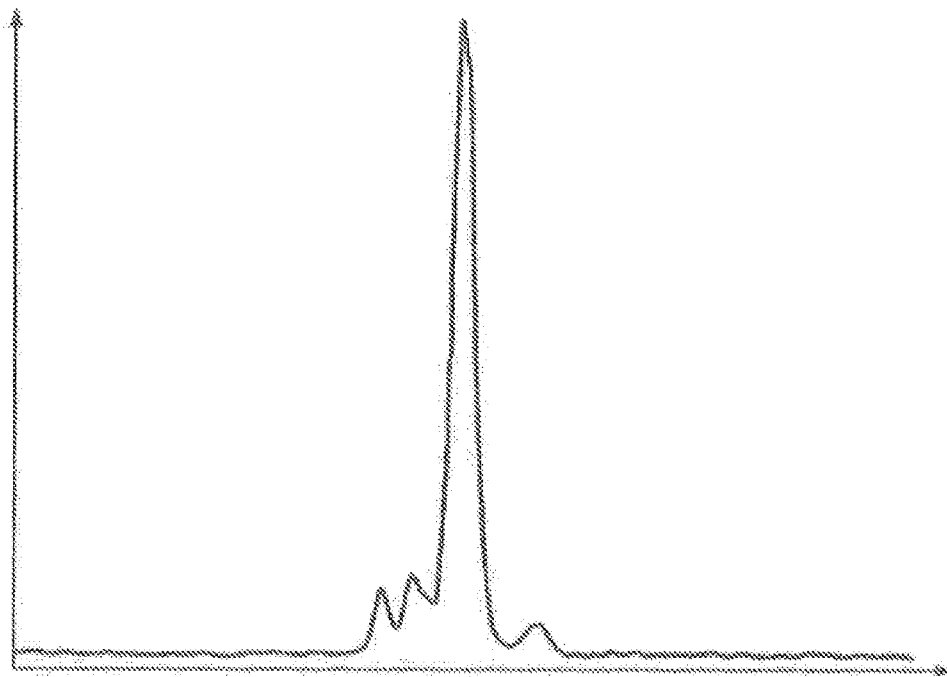


FIG. 3B

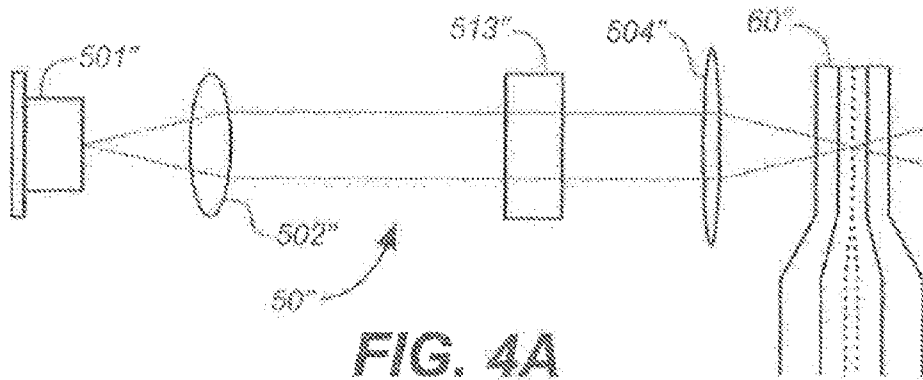


FIG. 4A

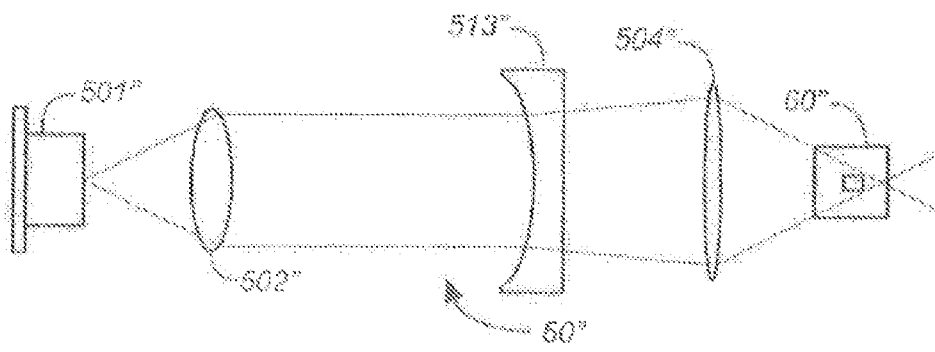
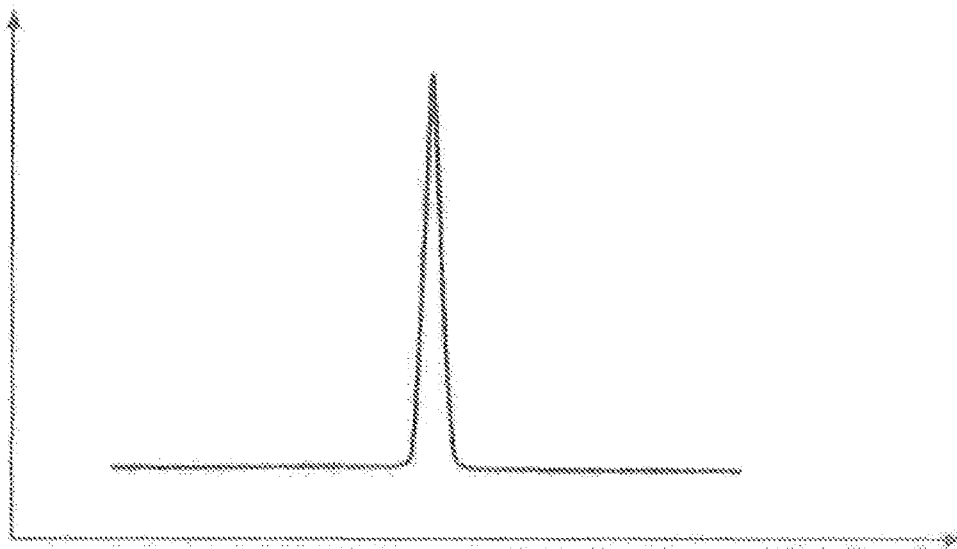
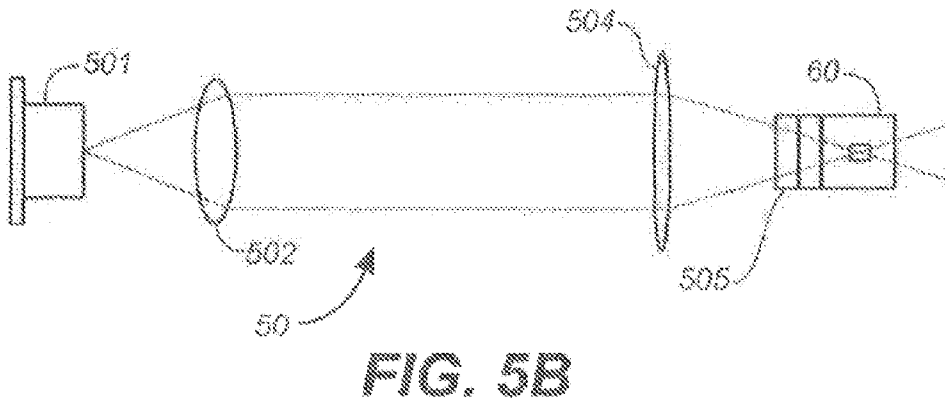
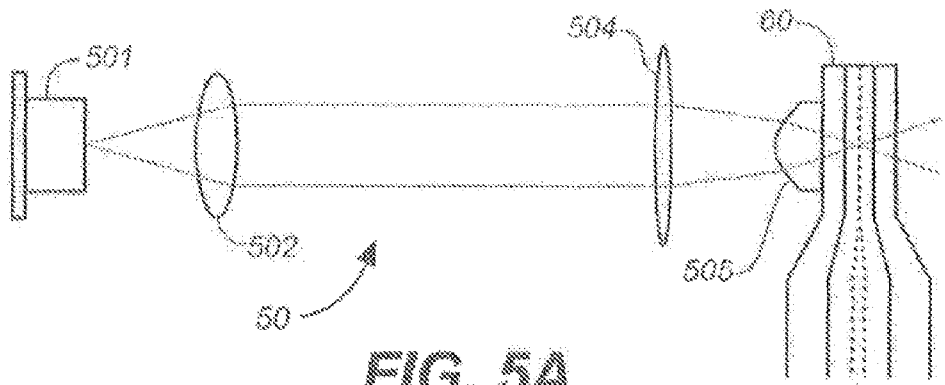
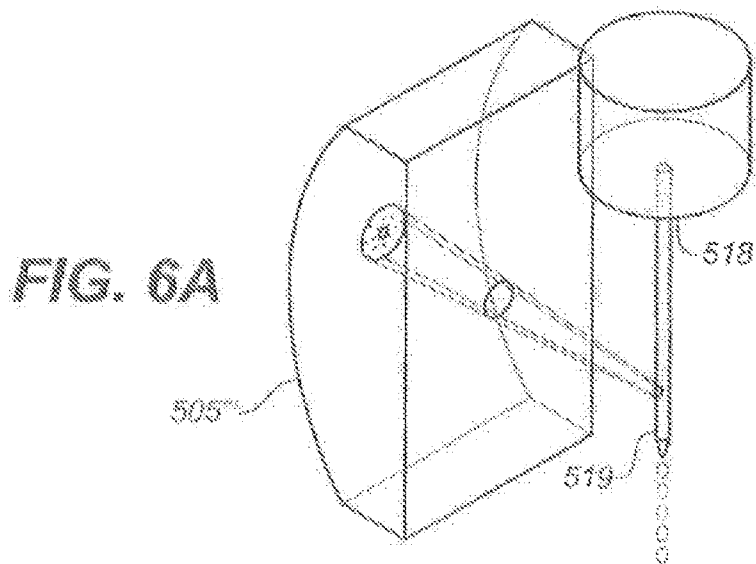
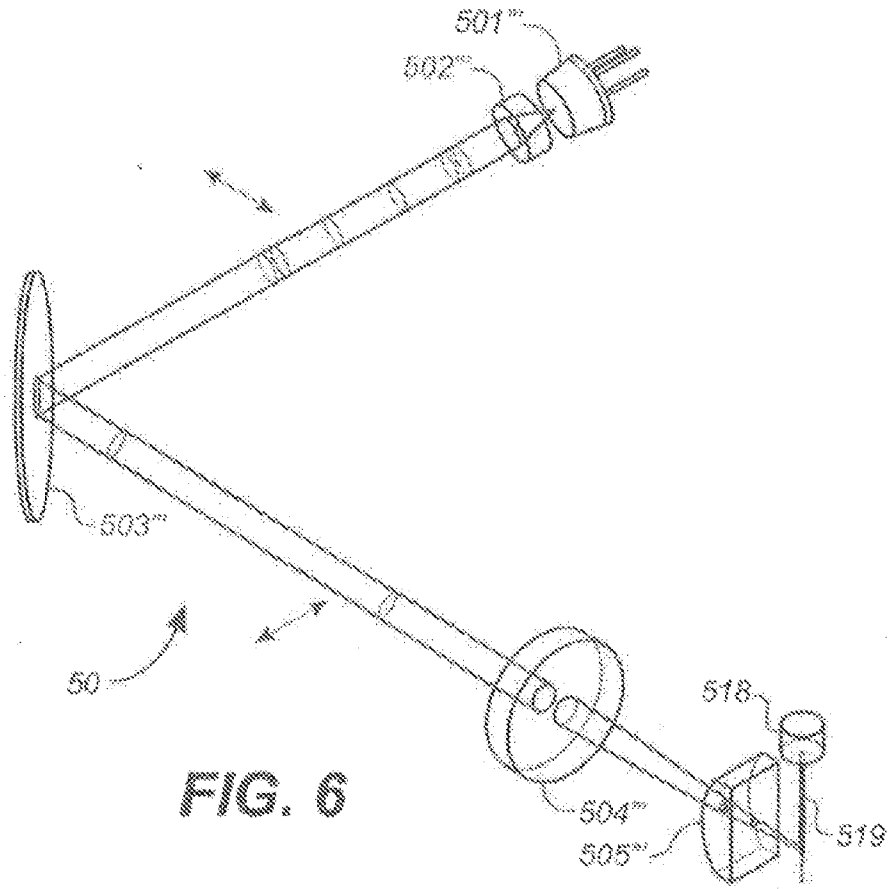
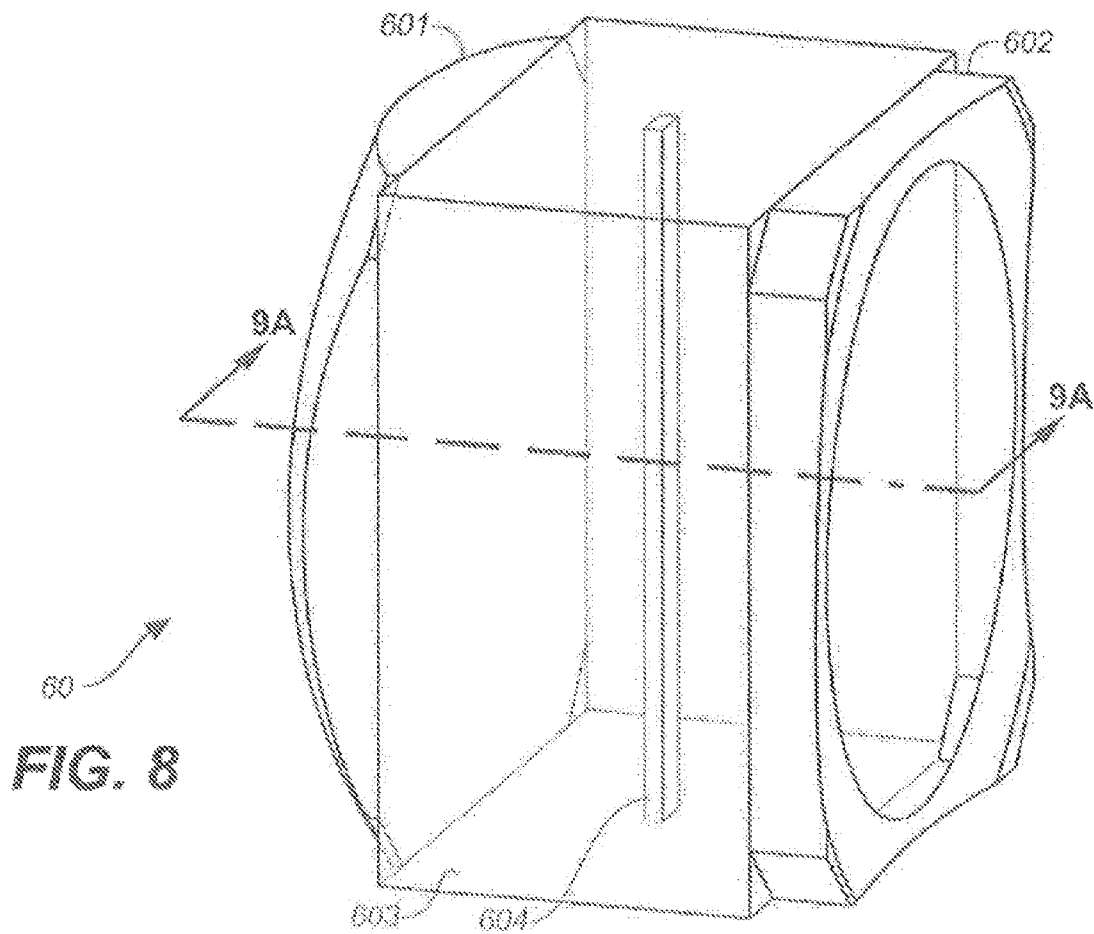
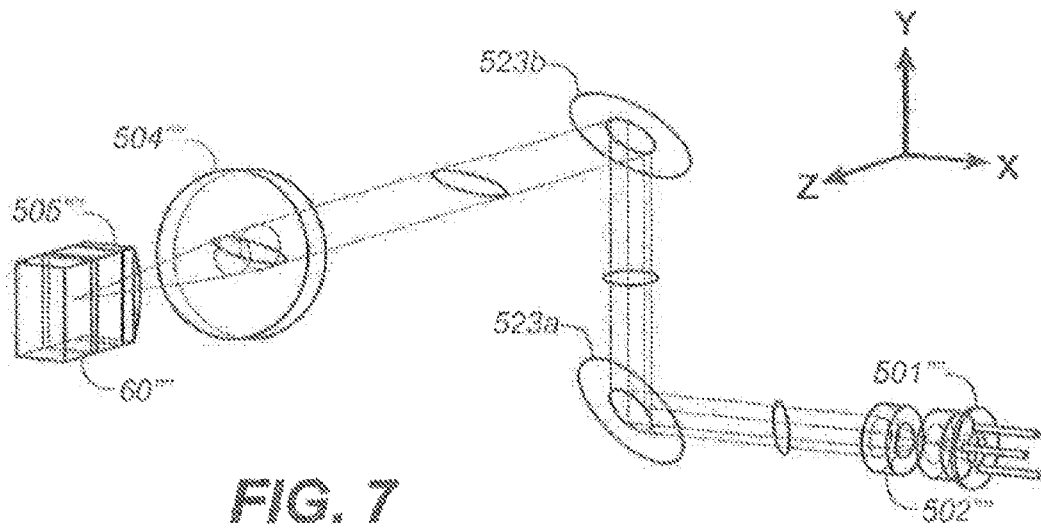
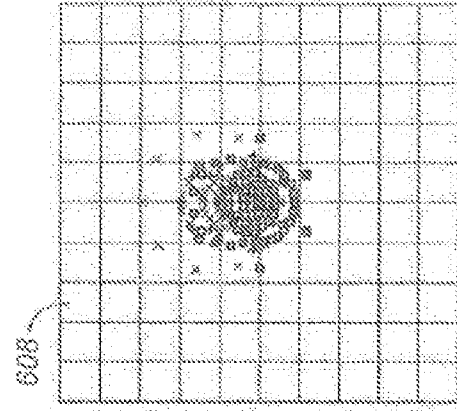
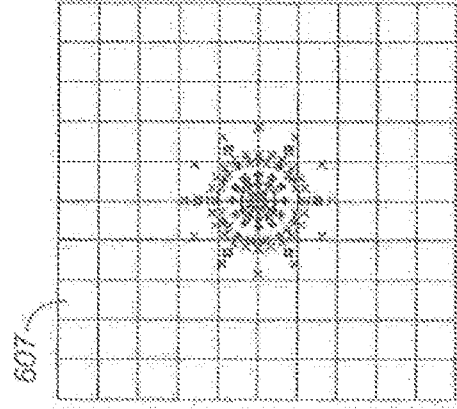
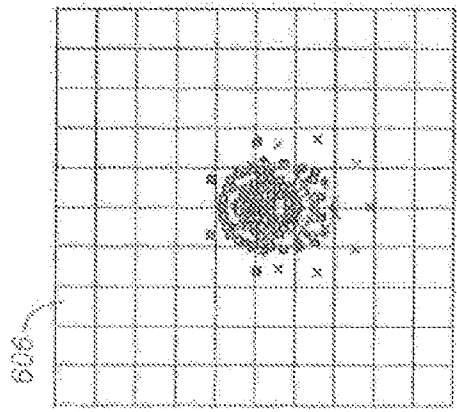
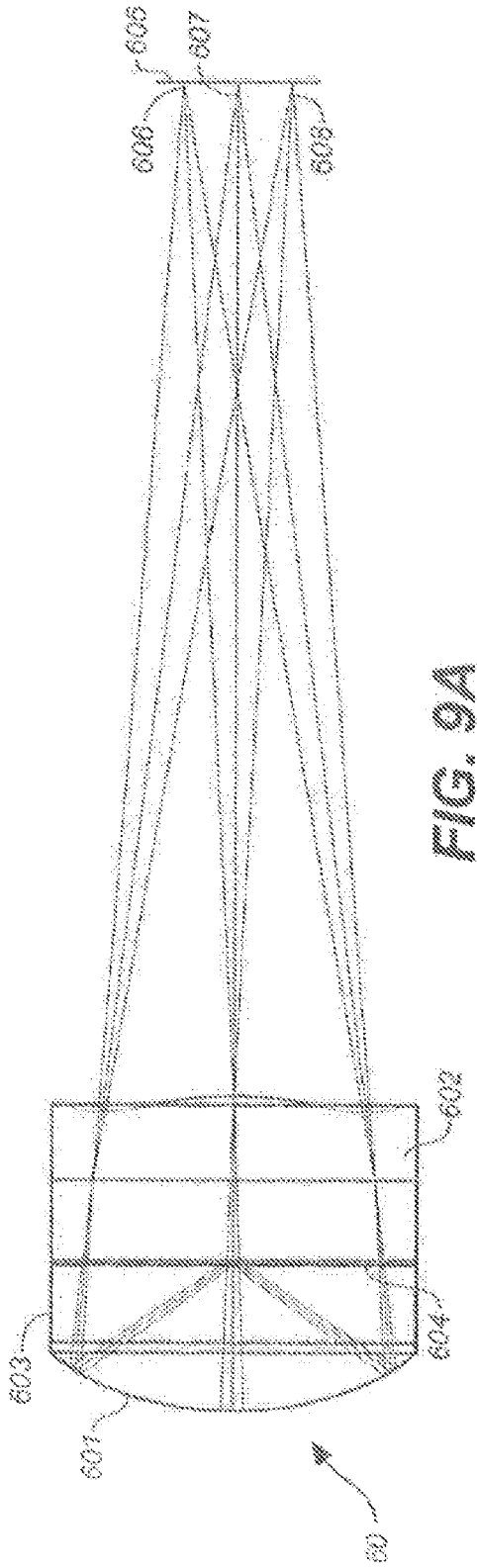


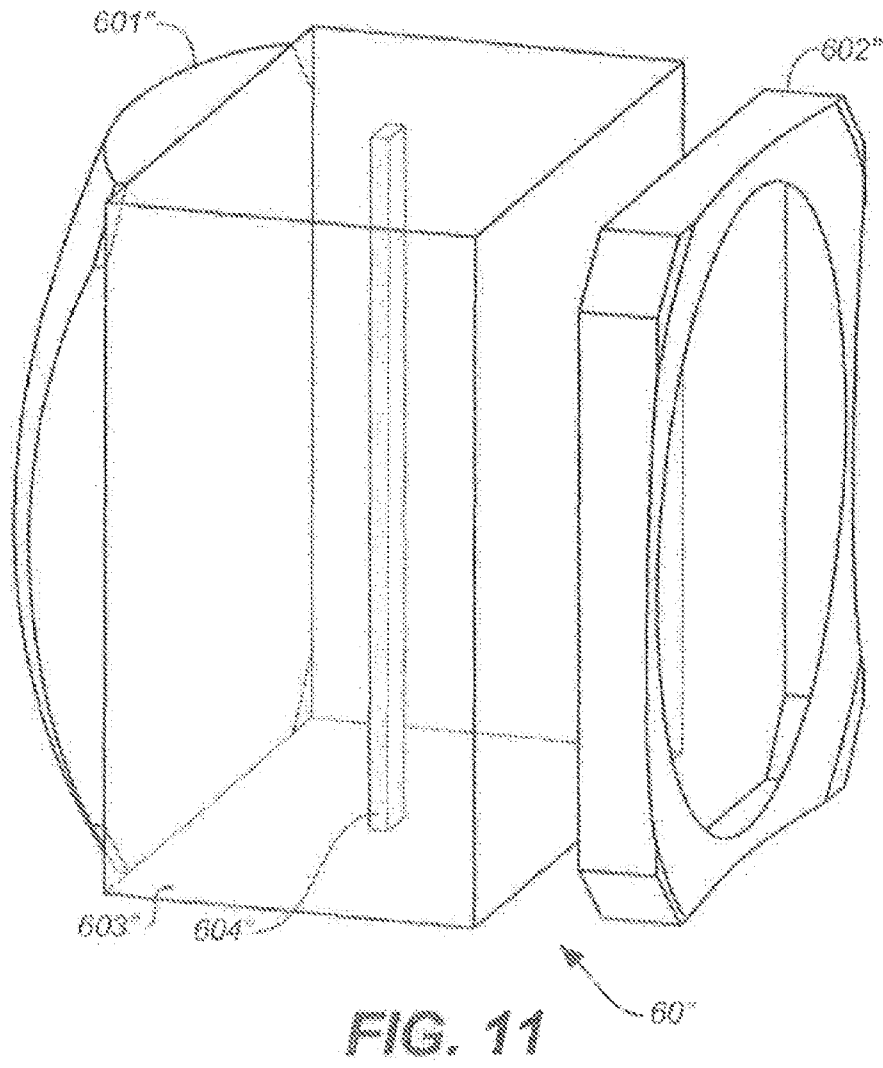
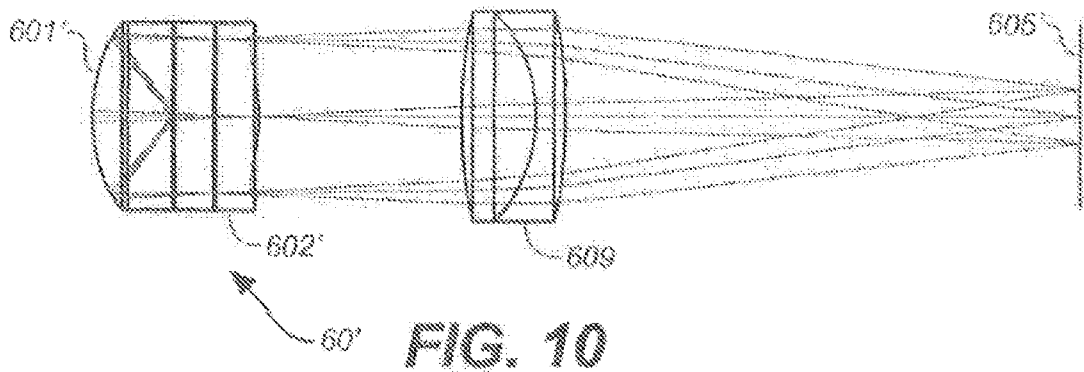
FIG. 4B

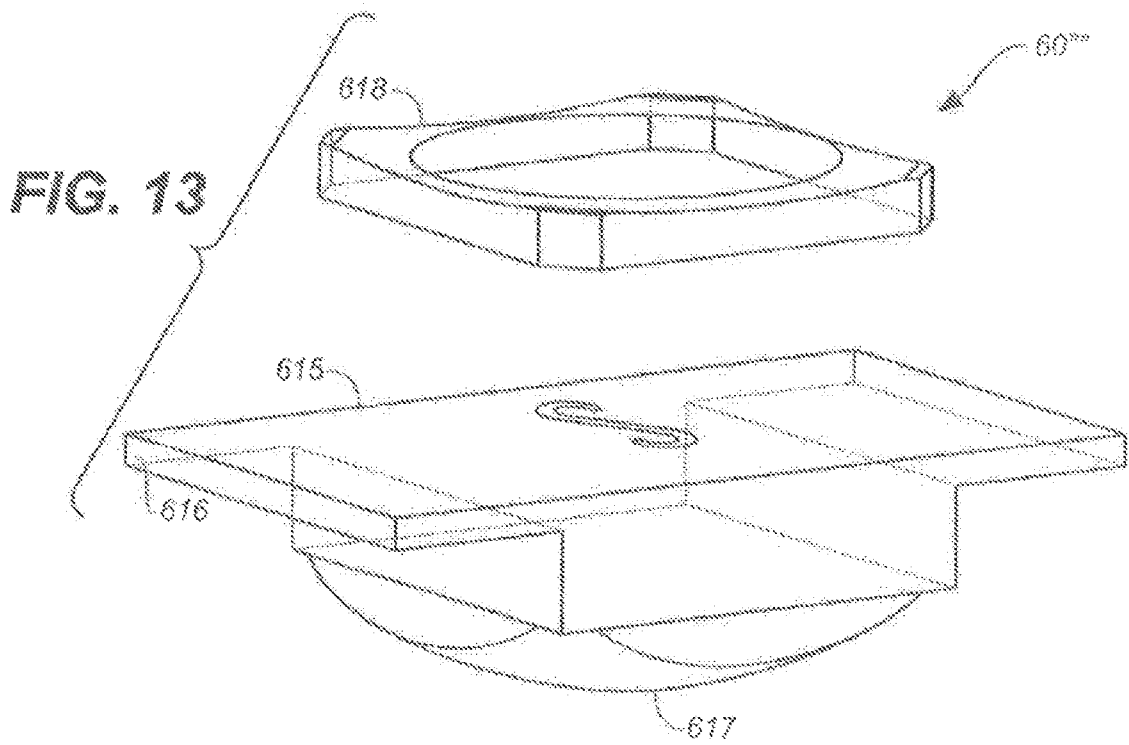
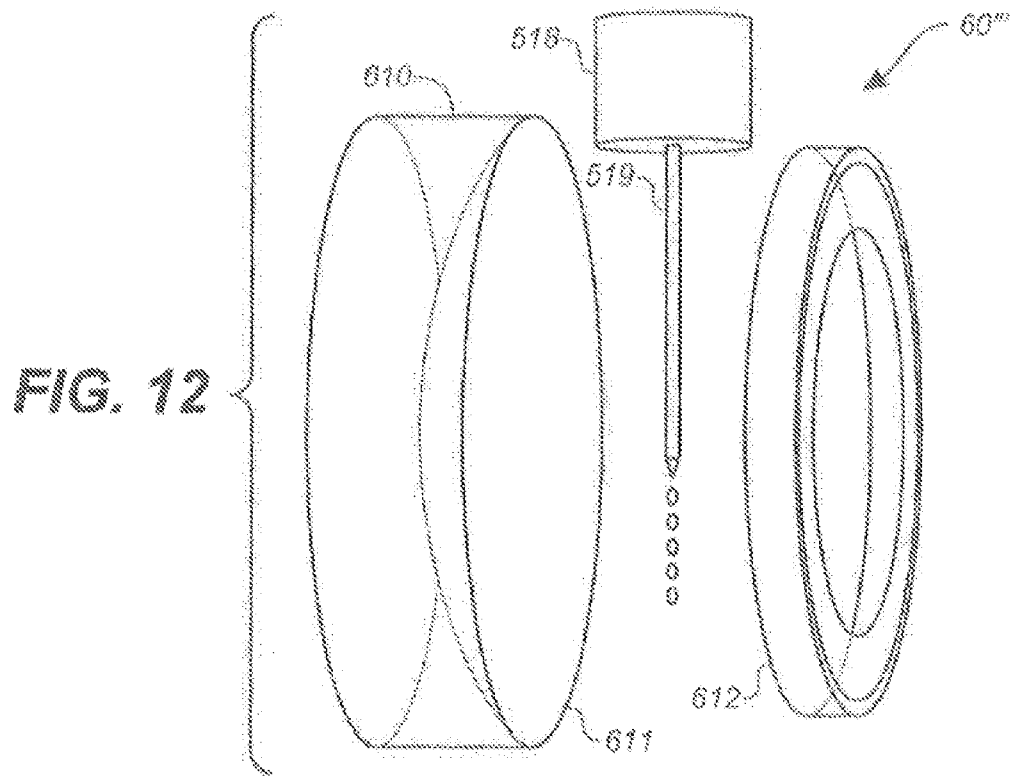












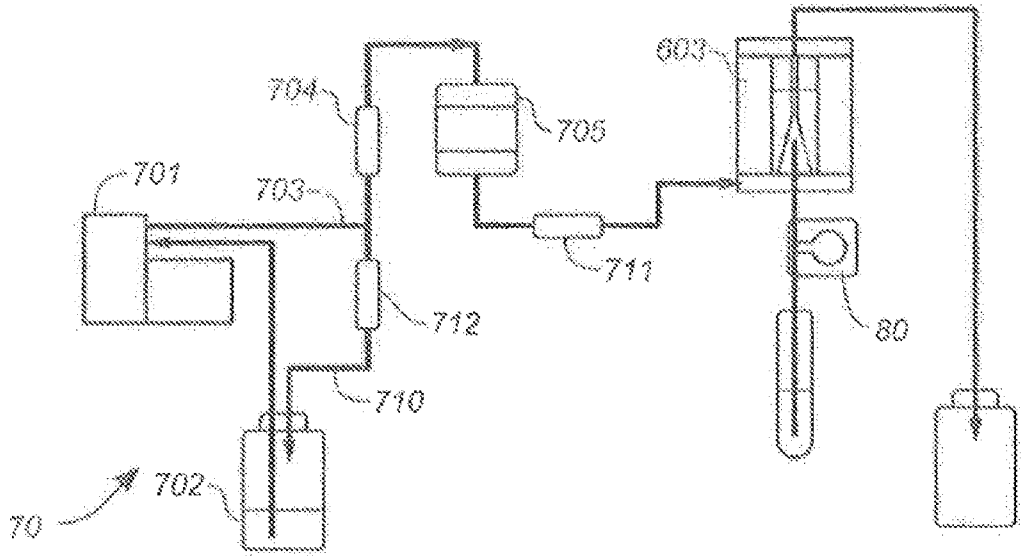


FIG. 14

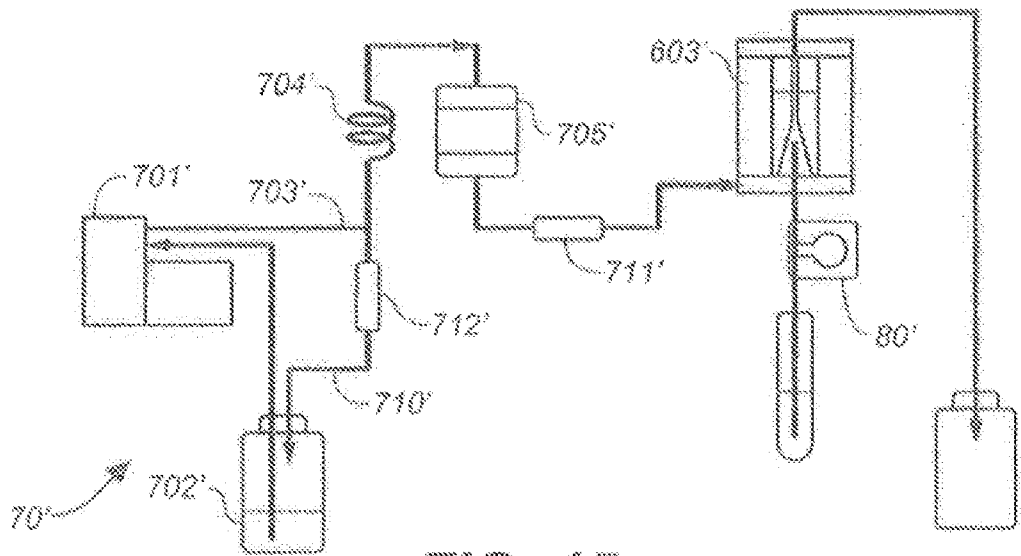
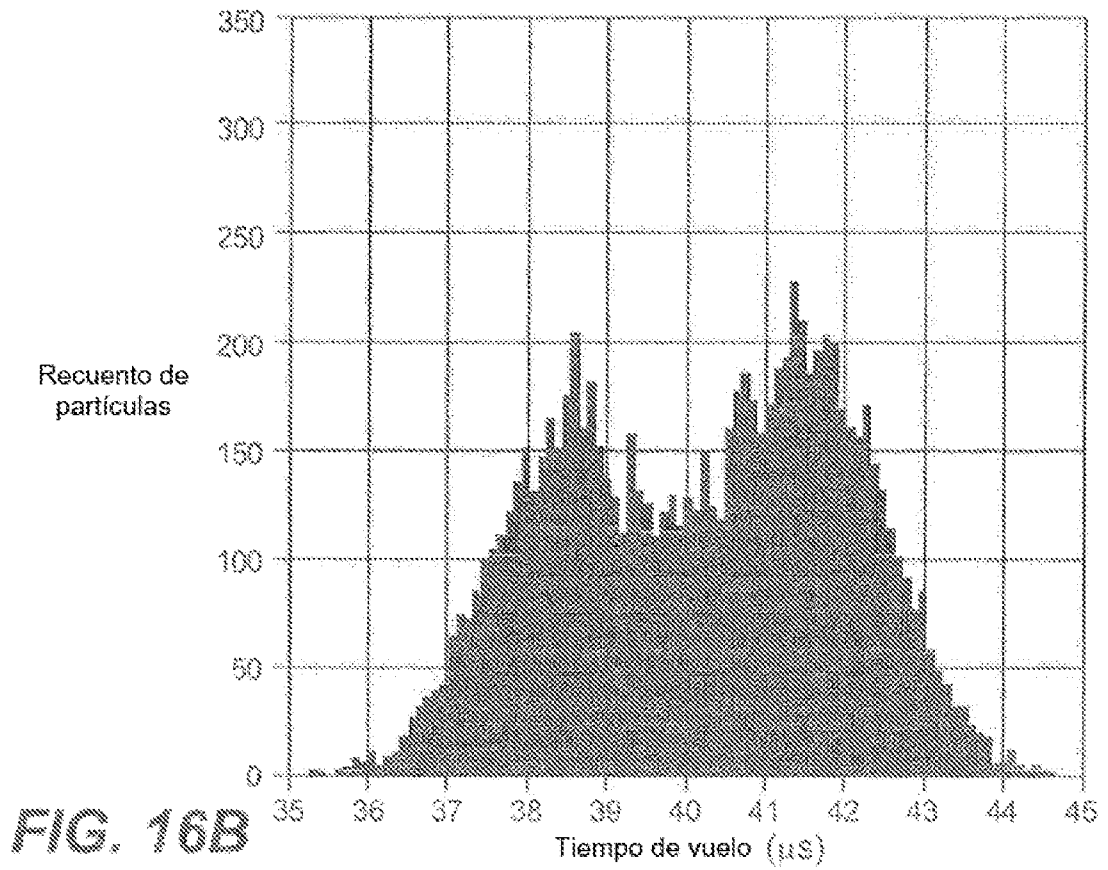
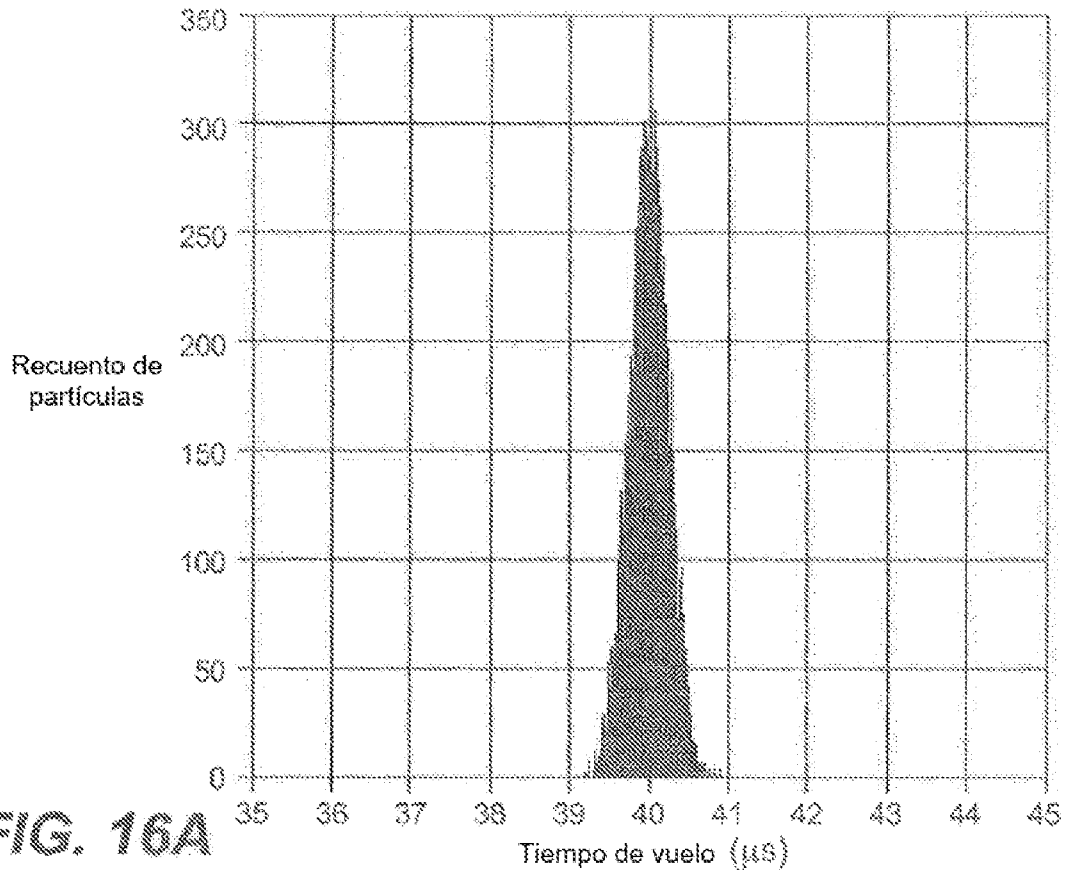


FIG. 15



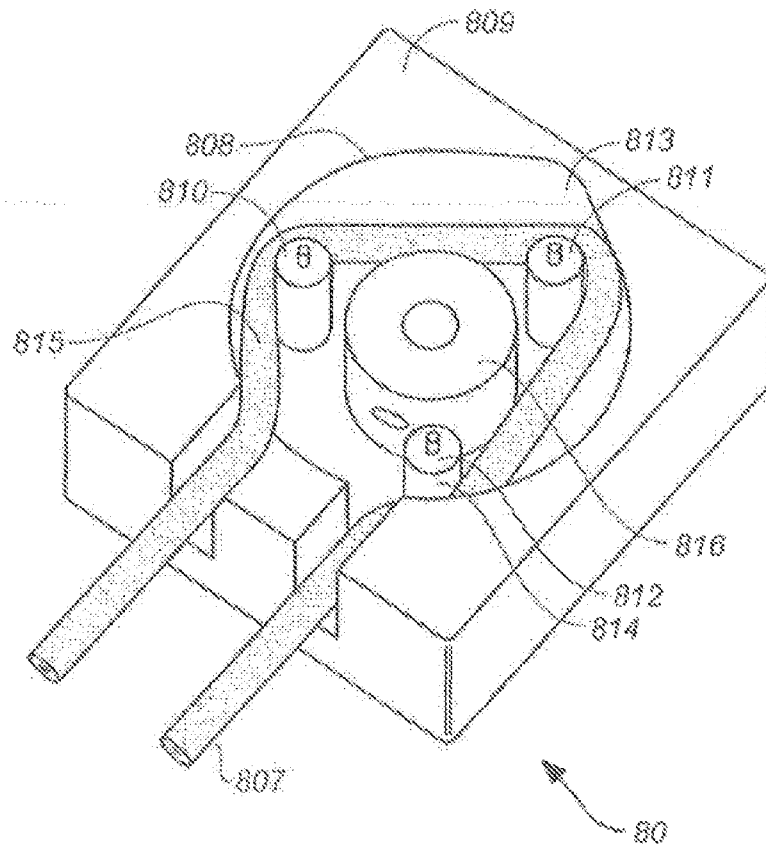


FIG. 17

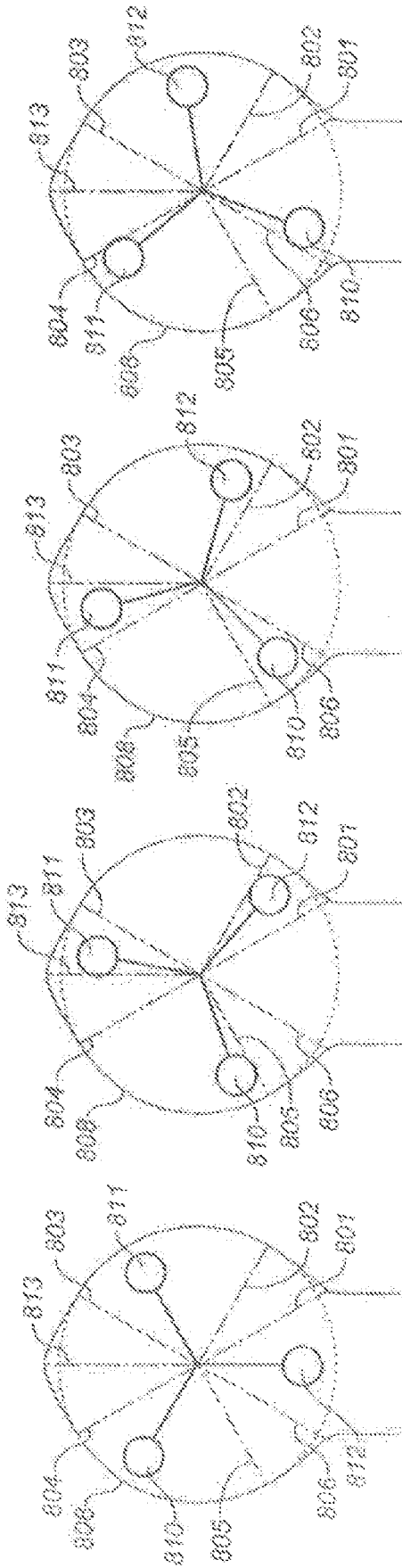


FIG. 18D

FIG. 18C

FIG. 18B

FIG. 18A

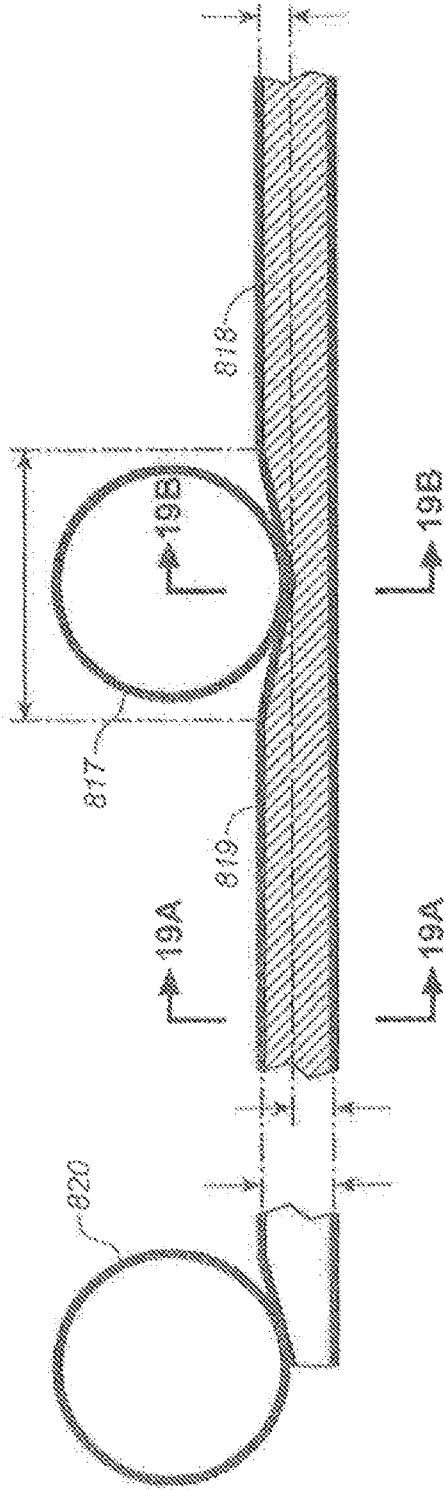


FIG. 19

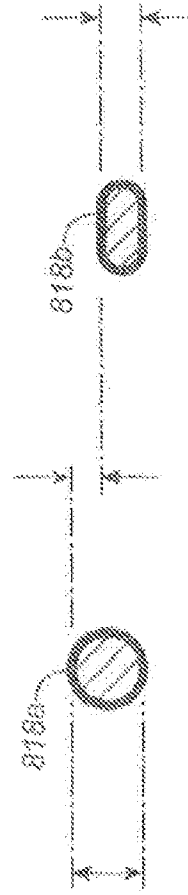


FIG. 19A FIG. 19B

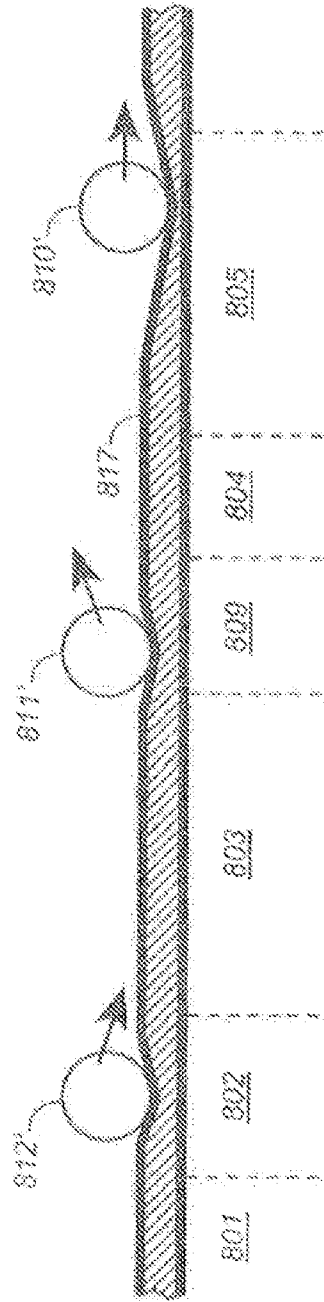


FIG. 20A

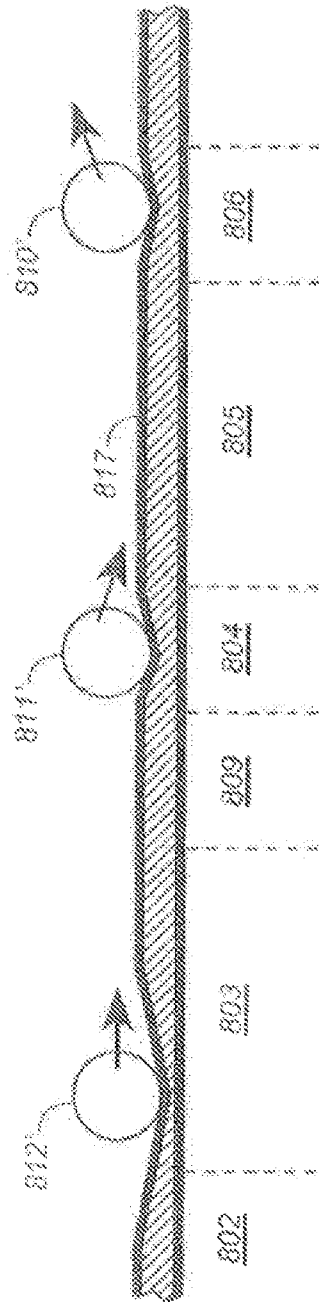


FIG. 20B

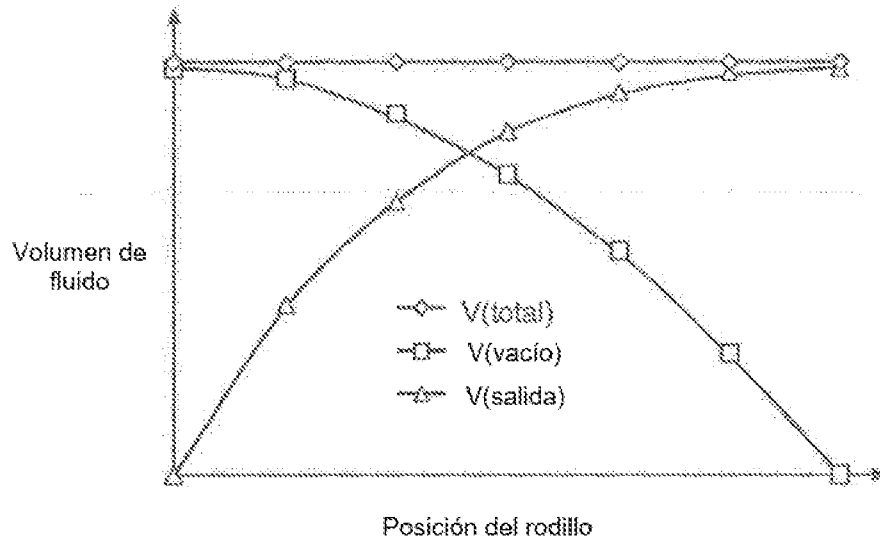


FIG. 21

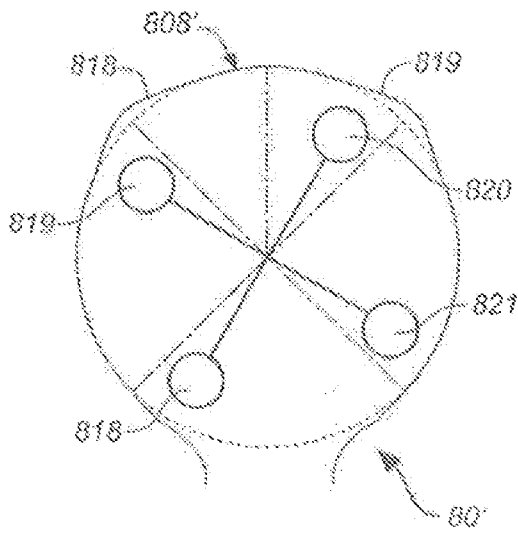


FIG. 22

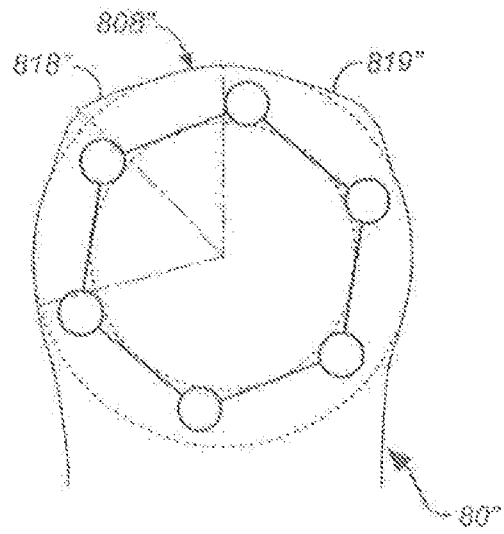


FIG. 23

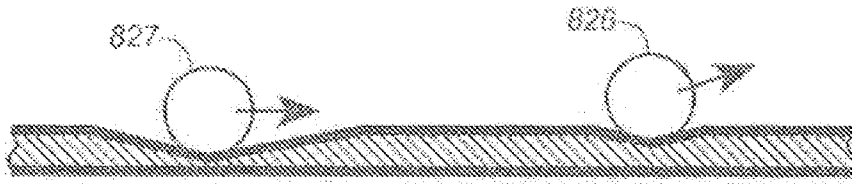


FIG. 24A

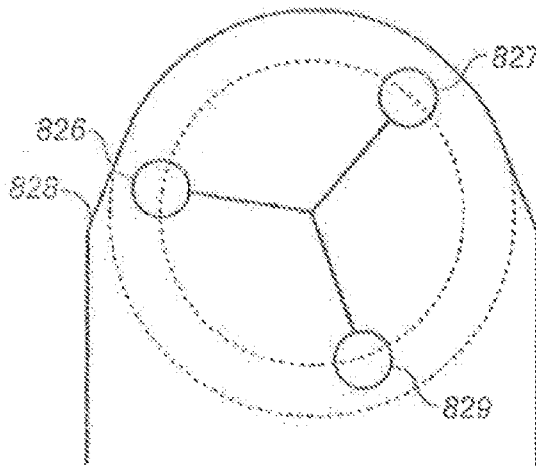
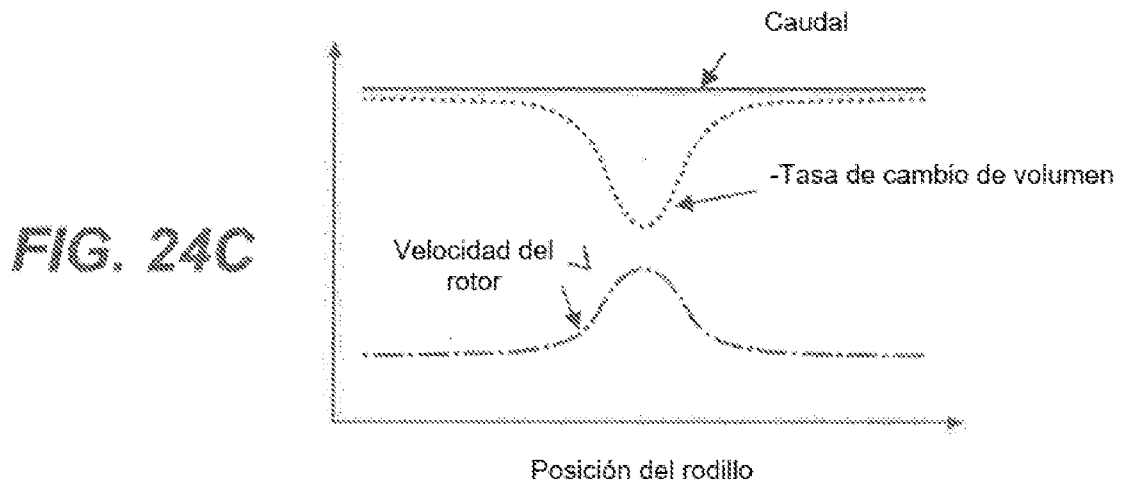


FIG. 24B



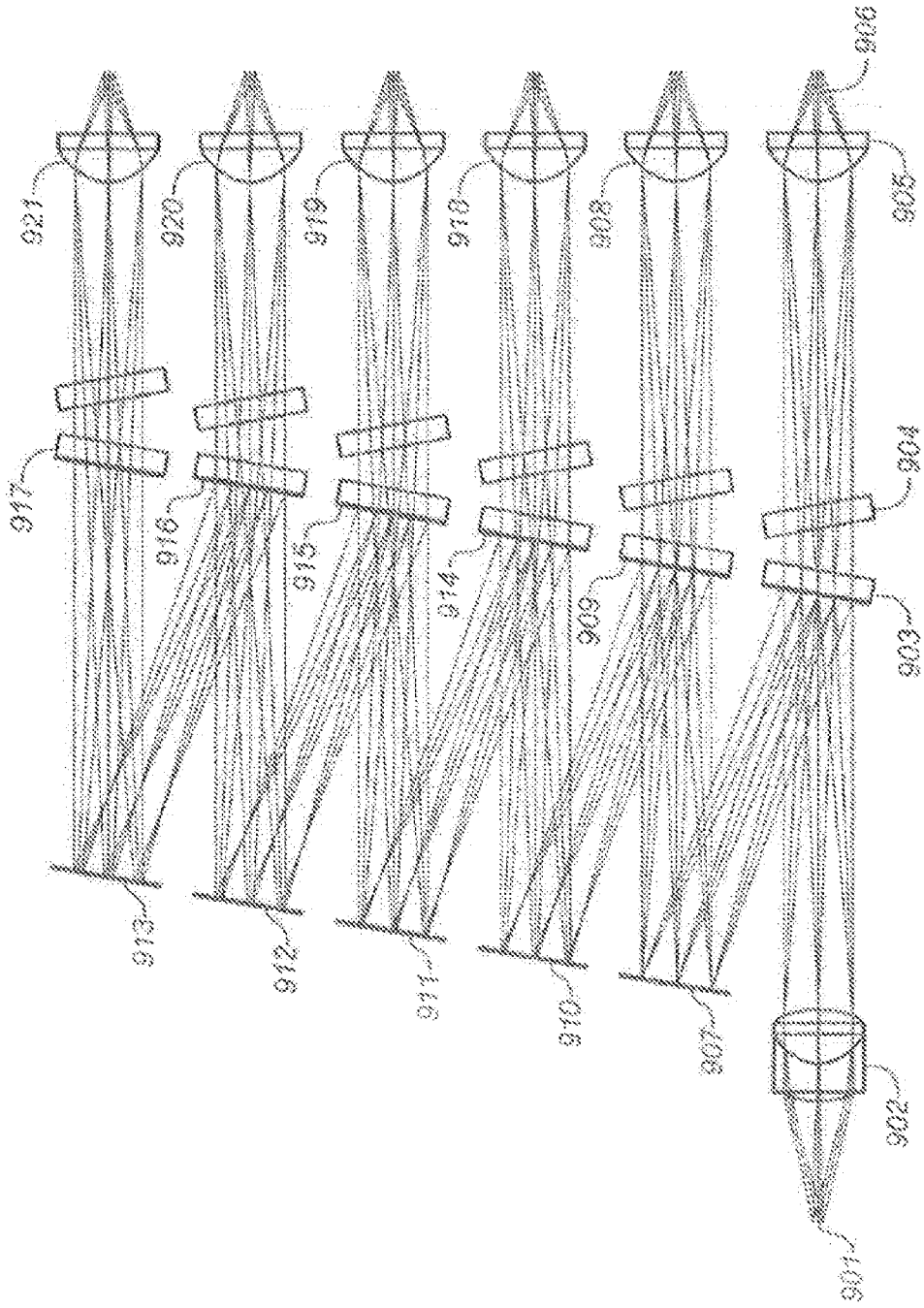


FIG. 25

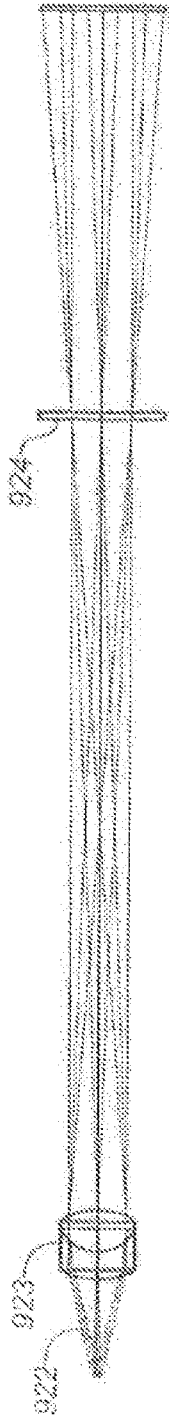


FIG. 26

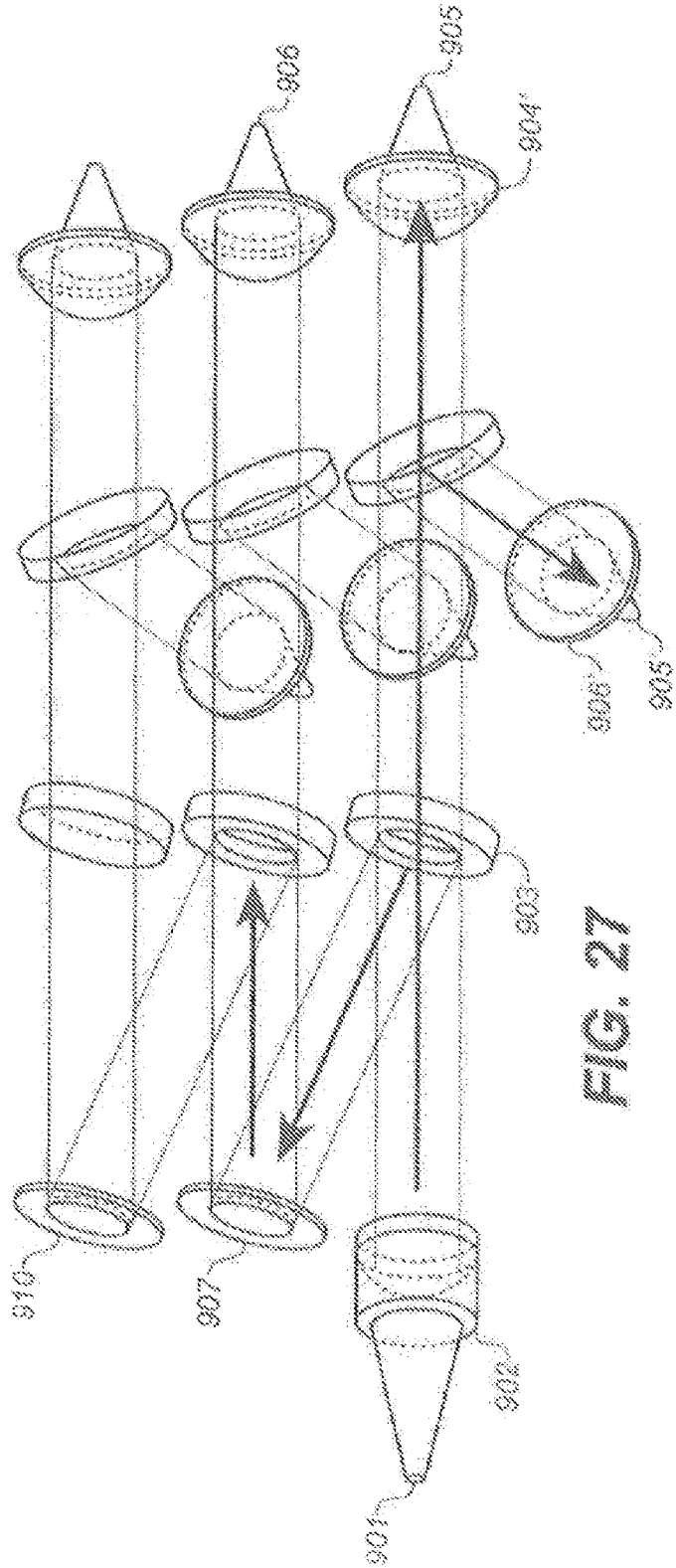


FIG. 27

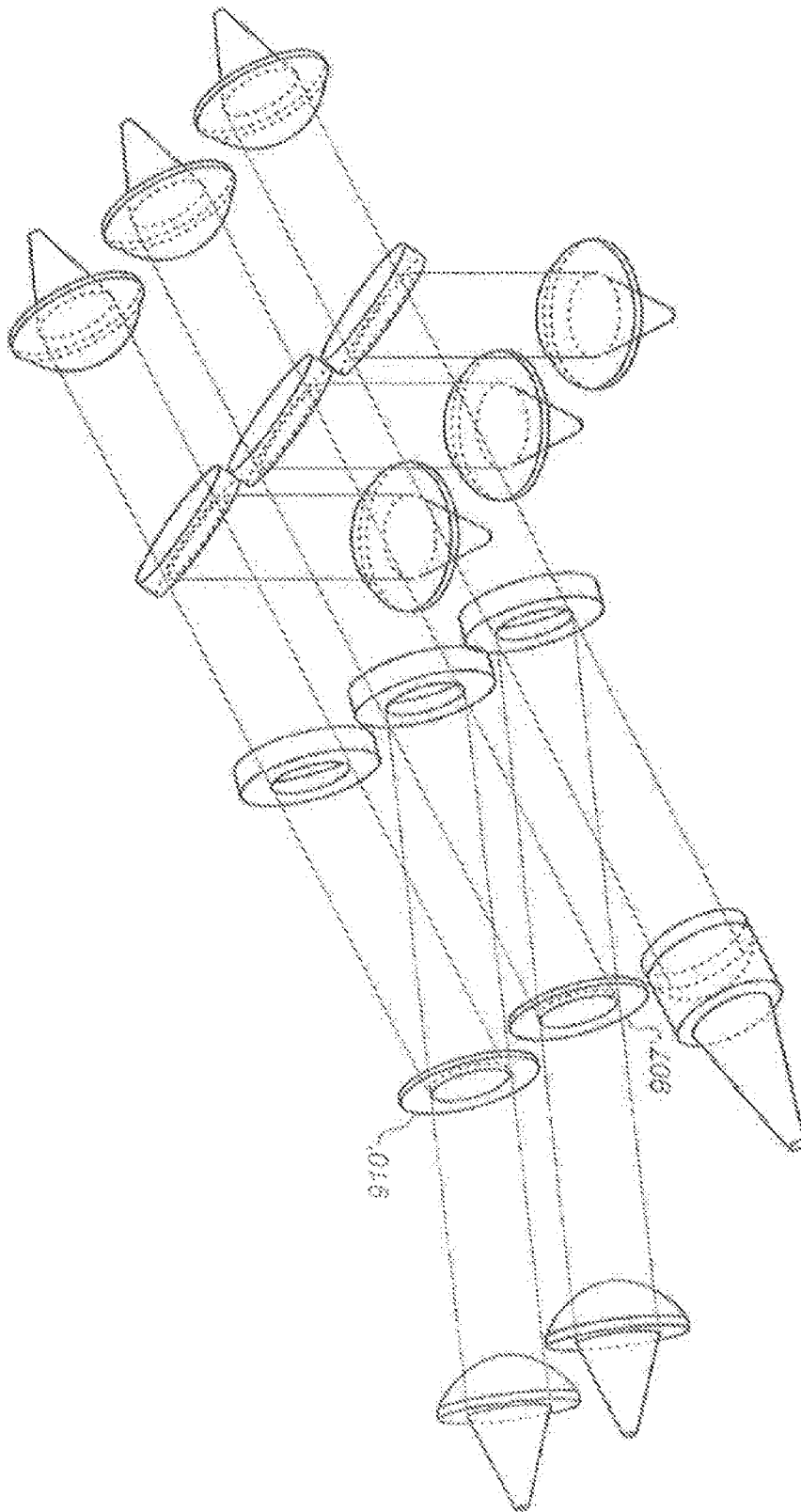


FIG. 28

FIG. 29A

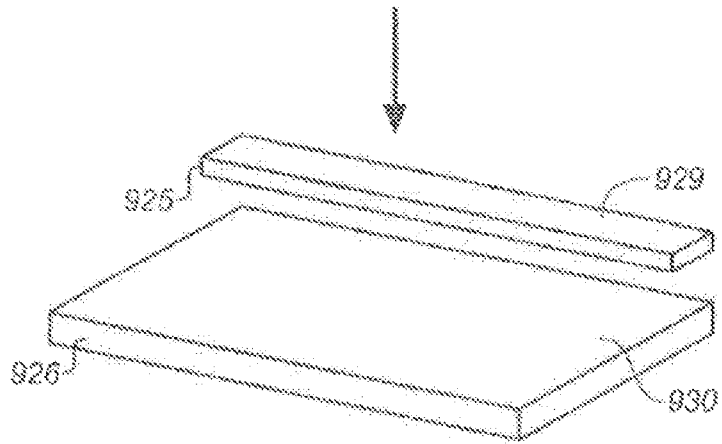


FIG. 29B

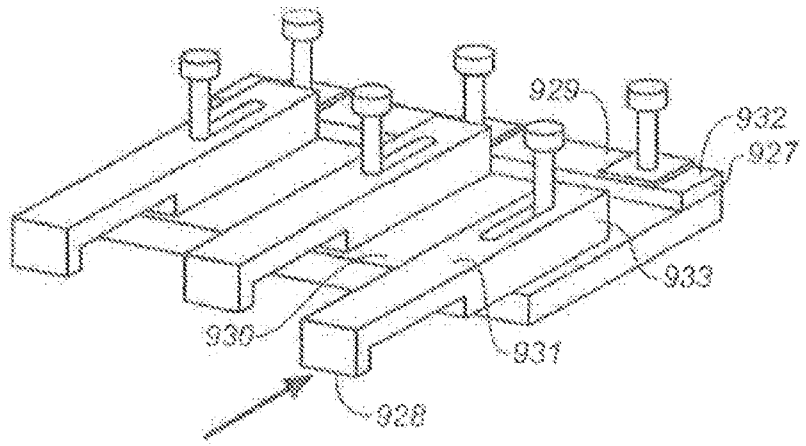


FIG. 29C

