

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 942**

51 Int. Cl.:

G01N 1/31 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

G01N 35/10 (2006.01)

G01B 11/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2012 PCT/US2012/046784**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13016037**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2012 E 12746417 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2734825**

54 Título: **Detección y posicionamiento de aplicador de muestras**

30 Prioridad:

22.07.2011 US 201161510728 P

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

23.07.2020

73 Titular/es:

**ROCHE DIAGNOSTICS HEMATOLOGY, INC.
(100.0%)**

**9115 Hague Rd.
Indianapolis IN 46250, US**

72 Inventor/es:

**ZAHNISER, RUSSELL;
ZAHNISER, DAVID;
CONROY, STEPHEN;
LEKNES, ERIC;
ZAHNISER, MICHAEL y
PAWLOWSKI, FRANK**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 774 942 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

Detección y posicionamiento de aplicador de muestras

5 CAMPO TÉCNICO

La presente divulgación se refiere a procedimientos y sistemas para posicionar aplicadores de muestras para distribuir una muestra sobre un sustrato.

10 ANTECEDENTES

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

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

Un procedimiento de preparación de muestras que produzca una muestra uniforme de alta calidad haría que la evaluación visual de la muestra fuera tanto más fácil como más exacta. Además, para las muestras preparadas usando un volumen conocido de la muestra de una manera altamente invariable, es posible automatizar la cuantificación de las propiedades de la muestra directamente desde la muestra, reemplazando la primera etapa del análisis de la muestra realizada tradicionalmente usando sistemas basados en flujo.

El documento US 2004/131758 A1 divulga un aparato distribuidor para un panel de pantalla de cristal líquido que incluye una jeringa que tiene una boquilla provista, en un extremo de la misma, un cuerpo en el que está montada la jeringa, un motor paso a paso de accionamiento vertical para mover el cuerpo en dirección vertical, un primer sensor para detectar si la boquilla de la jeringa está en contacto con un sustrato, un segundo sensor para detectar una distancia de separación entre la boquilla y el sustrato, y una unidad principal para controlar el motor paso a paso de accionamiento vertical en respuesta a una salida del segundo sensor para obtener una distancia de separación deseada entre la boquilla y el sustrato.

El documento US 2005/212837 A1 divulga un aparato de procesamiento que realiza un procesamiento predeterminado mientras suministra un líquido de procesamiento a un sustrato.

El documento US 2006/144331 A1 divulga procedimientos y aparatos para distribuir muestras o reactivos sobre un objeto objetivo.

El documento US 2008/210894 A1 divulga un aparato distribuidor de sellador para distribuir con mayor precisión un sellador sobre un sustrato, y un procedimiento de control del mismo. El aparato distribuidor de sellador incluye una fase en la que se monta un sustrato; una boquilla para distribuir un sellador mientras se hace un movimiento relativo con el sustrato; una jeringa acoplada a la boquilla, para almacenar el sellador; y un sensor de distancia instalado en ambos lados de una parte inferior de la jeringa, para medir una distancia vertical entre un plano principal del sustrato y una salida de la boquilla.

El documento US5437242 A divulga un procedimiento y un aparato para el control exacto y simple del nivel de fusión cuando se extraen cristales individuales de acuerdo con el procedimiento de Czochralski.

El documento US 4618261 A divulga una lente o un cable de fibra óptica que focaliza la energía de un rayo láser de helio y neón colimado sobre un punto en una máscara. Parte de la energía focalizada se refleja desde la máscara sobre una matriz de fotodetectores en un plano de imagen, y parte de esta energía se refleja desde un sustrato estrechamente adyacente a la máscara después de pasar a través de la máscara sobre la matriz de fotodetectores para producir un patrón de interferencia que es detectado y está caracterizado por una frecuencia espacial representativa de la distancia entre la máscara y el sustrato.

SUMARIO

- Los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento se usan durante la preparación automatizada de muestras en la que se usan aplicadores de muestras para distribuir muestras de líquido sobre sustratos tales como portaobjetos. La distribución con éxito de líquidos para obtener muestras de distribución relativamente uniforme por todo un sustrato depende, en parte, de controlar la posición del aplicador de muestras con respecto a la superficie del sustrato que recibe la muestra. Para lograr un control preciso sobre el aplicador de muestras, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento están configurados para determinar la posición del aplicador de muestras con respecto a la superficie del sustrato en base a una o más imágenes del aplicador, incluyendo las imágenes reflejadas desde la superficie del sustrato. La(s) imagen(es) incluyen tanto una región de imagen directa que corresponde a una imagen directa (por ejemplo, no reflejada) del aplicador de muestras por encima del sustrato como una primera región de imagen reflejada que corresponde a una imagen del aplicador de muestras que se refleja desde la superficie del sustrato.
- La posición del aplicador con respecto a la superficie del sustrato se puede determinar en base a la distancia entre los bordes del aplicador de muestras en la región de imagen directa y la primera región de imagen reflejada. Los procedimientos y los sistemas que implementan los procedimientos se pueden extender para determinar la posición del aplicador de muestras en múltiples localizaciones transversales con respecto al sustrato. Determinando inicialmente un conjunto de posiciones adecuadas del aplicador con respecto a la superficie del sustrato (por ejemplo, en las esquinas del sustrato), se pueden interpolar señales de control adecuadas para producir las posiciones deseadas del aplicador en otras localizaciones sobre la superficie del sustrato. De esta manera, se puede lograr un control preciso sobre la posición del aplicador de muestras con respecto a la superficie del sustrato durante la distribución de una muestra de líquido sobre el sustrato.
- En general, en un primer aspecto, la divulgación presenta procedimientos de posicionamiento de un aplicador de muestras con respecto a un sustrato, incluyendo los procedimientos: (a) obtener una imagen del aplicador de muestras cerca del sustrato, incluyendo la imagen una región de imagen directa correspondiente al aplicador de muestras y una primera región de imagen reflejada correspondiente a una imagen del aplicador de muestras reflejada desde una superficie del sustrato; (b) determinar una posición de un borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa; (c) determinar una posición de un borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada; (d) determinar una distancia entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras; y (e) determinar la posición del aplicador de muestras con respecto al sustrato en base a la distancia entre los bordes.
- Las implementaciones de los procedimientos pueden incluir uno cualquiera o más de los siguientes rasgos característicos.
- Obtener la imagen del aplicador de muestras cerca del sustrato puede incluir orientar un detector en un ángulo con respecto a la superficie del sustrato, y registrar la imagen usando el detector.
- La posición del aplicador de muestras con respecto al sustrato puede incluir una altura del aplicador de muestras por encima de la superficie del sustrato. Determinar la altura del aplicador de muestras por encima de la superficie del sustrato puede incluir calcular la altura en base a la información de referencia que incluye información de correlación que relaciona la distancia entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras con la altura.
- Los procedimientos pueden incluir medir un conjunto de distancias entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras, donde medir cada miembro del conjunto de distancias incluye: (a) trasladar el aplicador de muestras a una nueva altura por encima de la superficie del sustrato; (b) obtener una segunda imagen del aplicador de muestras a la nueva altura cerca del sustrato, incluyendo la segunda imagen una región de imagen directa correspondiente al aplicador de muestras y una primera región de imagen reflejada correspondiente a una imagen del aplicador de muestras reflejada desde la superficie del sustrato; (c) determinar una posición de un borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa de la segunda imagen; (d) determinar una posición de un borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada de la segunda imagen; y (e) determinar una distancia entre el borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa y el borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada de la segunda imagen.
- Los procedimientos pueden incluir determinar una configuración de control asociada con una posición objetivo del aplicador de muestras por interpolación entre distancias en el conjunto de distancias medido. Los procedimientos pueden incluir almacenar en una unidad de almacenamiento la configuración de control e información sobre una localización del aplicador de muestras con respecto al sustrato. El conjunto de distancias puede incluir al menos dos distancias (por ejemplo, al menos diez distancias).
- Los procedimientos pueden incluir: (a) trasladar el aplicador de muestras en una dirección perpendicular a un eje central del aplicador a una nueva localización con respecto al sustrato; (b) medir un conjunto de distancias entre

el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras; (c) determinar una configuración de control asociada con una posición objetivo del aplicador de muestras en la nueva localización; y (d) almacenar la configuración de control e información sobre la nueva localización en la unidad de almacenamiento. Los procedimientos pueden incluir repetir las etapas de trasladar el aplicador de muestras en una dirección perpendicular al eje central del aplicador de muestras a una nueva localización con respecto al sustrato, medir un conjunto de distancias entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras, determinar una configuración de control asociada con una posición objetivo del aplicador de muestras en la nueva localización, y almacenar la configuración de control e información sobre la nueva localización en la unidad de almacenamiento, hasta que un número de localizaciones sobre las que se almacena información sea de tres o más (por ejemplo, seis o más).

Los procedimientos pueden incluir determinar coeficientes de una ecuación de una superficie del sustrato. Los procedimientos pueden incluir determinar una orientación del sustrato con respecto a un plano perpendicular al eje central del aplicador de muestras. Determinar una orientación del sustrato puede incluir determinar una pendiente de la superficie del sustrato con respecto al plano perpendicular al eje central del aplicador de muestras.

Determinar una posición de un borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa puede incluir: (a) seleccionar columnas de píxeles en la región de imagen directa que se extienden en una dirección paralela a un eje central del aplicador de muestras; (b) para cada columna seleccionada, determinar una posición de cambio de intensidad máximo dentro de la columna; (c) determinar la posición del borde del aplicador de muestras en base a las posiciones de cambio de intensidad máximo en cada columna seleccionada de píxeles. Determinar la posición del cambio de intensidad máximo dentro de cada columna seleccionada puede incluir: (a) para cada par de píxeles adyacentes en la columna seleccionada, determinar un cambio de intensidad; (b) determinar un cambio de intensidad máximo entre pares de píxeles adyacentes en la columna seleccionada; y (c) ajustar una forma funcional al cambio de intensidad máximo entre pares de píxeles adyacentes para determinar la posición del cambio de intensidad máximo dentro de la columna seleccionada. Determinar la posición del borde del aplicador de muestras puede incluir ajustar las posiciones de cambio de intensidad máximo dentro de cada columna seleccionada a una forma funcional. Determinar la posición del borde del aplicador de muestras puede incluir determinar un punto de vértice del aplicador de muestras en base a la forma funcional ajustada.

Determinar la posición del borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada puede incluir: (a) seleccionar filas de píxeles en la primera región de imagen reflejada que se extienden en una dirección perpendicular a un eje alargado de la imagen del aplicador de muestras; (b) para cada fila seleccionada, determinar un promedio de intensidades de píxeles más altas m en la fila, y determinar un promedio de intensidades de píxeles más bajas k en la fila; (c) determinar un nivel de contraste asociado con la fila como una diferencia entre el promedio de las intensidades de píxeles más altas m y el promedio de las intensidades de píxeles más bajas k ; y (d) determinar la posición del borde reflejado del aplicador de muestras en base al nivel de contraste en cada fila seleccionada. Determinar la posición del borde reflejado del aplicador de muestras en base al nivel de contraste en cada fila seleccionada puede incluir: (a) identificar una primera parte de la primera región de imagen reflejada en base a un nivel de contraste en cada fila de píxeles seleccionada, donde la primera parte no incluye la imagen del aplicador de muestras; (b) identificar una segunda parte de la primera región de imagen reflejada en base a un nivel de contraste en cada fila de píxeles seleccionada, donde la segunda parte incluye la imagen del aplicador de muestras; y (c) determinar la posición del borde reflejado del aplicador de muestras en base a una diferencia en los niveles de contraste entre las primera y segunda partes de la primera región de imagen reflejada. La cantidad m puede corresponder a al menos una quinta parte del número total de píxeles en cada fila seleccionada, la cantidad k puede corresponder a al menos una quinta parte del número total de píxeles en cada fila seleccionada y puede que no haya ningún píxel en cada fila seleccionada que sea común a los píxeles m y los píxeles k .

La superficie del sustrato es una superficie superior del sustrato más cercana al aplicador de muestras. La imagen del aplicador de muestras cerca del sustrato puede incluir una segunda región de imagen reflejada correspondiente a una imagen del aplicador de muestras reflejada desde una superficie inferior del sustrato, y los procedimientos pueden incluir: (a) determinar una posición de un borde reflejado del aplicador de muestras en la segunda región de imagen reflejada; (b) determinar una distancia entre los bordes reflejados del aplicador de muestras en las primera y segunda regiones de imagen reflejada; y (c) determinar un grosor del sustrato en base a la distancia entre los bordes reflejados del aplicador de muestras en las primera y segunda regiones de imagen reflejada. Determinar el grosor del sustrato puede incluir calcular el grosor en base a información de referencia que incluye información de correlación que relaciona la distancia entre los bordes reflejados del aplicador de muestras con el grosor.

Determinar una posición del borde reflejado del aplicador de muestras en la segunda región de imagen reflejada puede incluir: (a) seleccionar filas de píxeles en la segunda región de imagen reflejada que se extienden en una dirección perpendicular a un eje alargado de la imagen del aplicador de muestras; (b) para cada fila seleccionada, determinar un promedio de intensidades de píxeles más altas p en la fila, y determinar un promedio de intensidades de píxeles más bajas q en la fila; (c) determinar un nivel de contraste asociado con la fila como una

diferencia entre el promedio de las intensidades de píxeles más altas p y el promedio de las intensidades de píxeles más bajas q ; y (d) determinar la posición del borde reflejado del aplicador de muestras en la segunda región de imagen reflejada en base a una diferencia entre el nivel de contraste en cada fila de píxeles seleccionada en la segunda región de imagen reflejada y el nivel de contraste en cada fila de píxeles seleccionada en la primera región de imagen reflejada. La cantidad p puede corresponder a al menos una quinta parte del número total de píxeles en cada fila seleccionada, la cantidad q puede corresponder a al menos una quinta parte del número total de píxeles en cada fila seleccionada, y puede que ningún píxel en cada fila seleccionada sea común a los píxeles p y los píxeles q .

Los procedimientos pueden incluir calibrar la información de correlación, donde calibrar la información de correlación incluye determinar un valor de señal de control de desplazamiento que provoca que un actuador del aplicador de muestras proporcione una fuerza ascendente que solo se superará por la fuerza de la gravedad, almacenar el valor de señal de control de desplazamiento, trasladar el aplicador de muestras hacia el sustrato hasta que una señal asociada con un error de traslación del actuador esté dentro de un umbral de error, y almacenar la posición del aplicador de muestras cuando la señal asociada con el error de traslación del actuador esté dentro del umbral de error. Calibrar la información de correlación puede incluir configurar la altura del aplicador de muestras a cero en la posición almacenada. Los procedimientos pueden incluir calibrar la información de correlación, donde calibrar la información de correlación incluye determinar un valor de señal de control de desplazamiento que provoca que un actuador del aplicador de muestras proporcione una fuerza ascendente que apenas se superará por la fuerza de la gravedad (por ejemplo, en algunas implementaciones aproximadamente un 0,5, 1, 2, 3, 4 o 5 % menos que la gravedad); almacenar el valor de señal de control de desplazamiento; bajar lentamente el aplicador de muestras hasta que una señal de control del actuador esté dentro de un umbral de error de la señal de control de desplazamiento; y almacenar la posición del aplicador de muestras cuando la señal de control del actuador esté dentro del umbral de error de la señal de control de desplazamiento.

Diversas implementaciones y modos de realización de los procedimientos también pueden incluir uno cualquiera o más de los otros rasgos característicos divulgados en el presente documento, en cualquier combinación, según sea apropiado.

En otro aspecto, la divulgación presenta sistemas que incluyen un aplicador de muestras, una etapa configurada para soportar un sustrato, un detector y un procesador electrónico, donde el sistema está configurado de modo que cuando un sustrato se soporta por la fase: (a) el detector está configurado para obtener una imagen del aplicador de muestras cerca del sustrato, la imagen que incluye una región de imagen directa correspondiente al aplicador de muestras y una primera región de imagen reflejada correspondiente a una imagen del aplicador de muestras reflejada desde una superficie del sustrato; y (b) el procesador electrónico está configurado para: (i) determinar una posición de un borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa; (ii) determinar una posición de un borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada; (iii) determinar una distancia entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras; y (iv) determinar la posición del aplicador de muestras con respecto al sustrato en base a la distancia entre los bordes.

Diversas implementaciones y modos de realización de los sistemas pueden incluir uno cualquiera o más de los siguientes rasgos característicos.

La posición del aplicador de muestras con respecto al sustrato puede incluir una altura del aplicador de muestras por encima de la superficie del sustrato, y el procesador electrónico se puede configurar para determinar la altura del aplicador de muestras en base a la información de referencia que incluye información de correlación que relaciona la distancia entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras con la altura.

El procesador electrónico se puede configurar para medir un conjunto de distancias entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras: (a) trasladar el aplicador de muestras a una nueva altura por encima de la superficie del sustrato; (b) obtener una segunda imagen del aplicador de muestras a la nueva altura cerca del sustrato, incluyendo la segunda imagen una región de imagen directa correspondiente al aplicador de muestras y una primera región de imagen reflejada correspondiente a una imagen del aplicador de muestras reflejada desde la superficie del sustrato; (c) determinar una posición de un borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa de la segunda imagen; (d) determinar una posición de un borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada de la segunda imagen; y (e) determinar una distancia entre el borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa y el borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada de la segunda imagen.

El procesador electrónico se puede configurar para determinar una configuración de control asociada con una posición objetivo del aplicador de muestras por interpolación entre distancias en el conjunto de distancias medido. El sistema puede incluir una unidad de almacenamiento conectada al procesador electrónico, donde el

procesador electrónico está configurado para almacenar la configuración de control e información sobre una localización del aplicador de muestras con respecto al sustrato en la unidad de almacenamiento.

5 El procesador electrónico se puede configurar para: (a) trasladar el aplicador de muestras en una dirección perpendicular a un eje central del aplicador de muestras a una nueva localización con respecto al sustrato; (b) medir un conjunto de distancias entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras; (c) determinar una configuración de control asociada con la posición objetivo del aplicador de muestras en la nueva localización; y (d) almacenar la configuración de control e información sobre la nueva localización en la unidad de almacenamiento. El procesador electrónico se puede configurar para determinar los coeficientes de una ecuación de un plano correspondiente a una superficie del sustrato en base a la configuración de control almacenada. El procesador electrónico se puede configurar para determinar una orientación del sustrato con respecto a un plano perpendicular al eje central del aplicador de muestras en base a la configuración de control almacenada.

15 Las implementaciones y modos de realización del sistema también pueden incluir uno cualquiera o más de los otros rasgos característicos divulgados en el presente documento, en cualquier combinación, según sea apropiado.

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

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

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

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

40 Una "región de imagen directa" corresponde a una región en una imagen que incluye una imagen directa del aplicador de muestras. Una imagen directa es una imagen que no se ha reflejado desde una superficie del sustrato. Una "primera región de imagen reflejada" es una región, típicamente de la misma imagen, que incluye una imagen del aplicador de muestras que se ha reflejado desde una superficie del sustrato (ya sea la superficie superior o la superficie inferior). Una "segunda región de imagen reflejada" es una región, típicamente de la misma imagen, que incluye una imagen del aplicador de muestras que también se ha reflejado desde una superficie del sustrato. En algunos modos de realización, las primera y segunda regiones de imagen reflejada corresponden a imágenes del aplicador de muestras que se han reflejado desde diferentes superficies del sustrato (por ejemplo, las superficies superior e inferior, respectivamente).

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

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

60 La cantidad de "nivel de contraste" es una medida de la variabilidad de la intensidad entre un conjunto de píxeles. El nivel de contraste se puede calcular como sigue: en primer lugar, seleccionando del conjunto de píxeles un primer subconjunto de píxeles con las intensidades más altas entre los píxeles del conjunto, y un segundo subconjunto con las intensidades más bajas entre los píxeles del conjunto; y en segundo lugar, calculando la diferencia entre las intensidades promedio para los dos subconjuntos. Los subconjuntos pueden ser un número fijo de píxeles o proporcional al tamaño del conjunto de píxeles (por ejemplo, 1/5 de los píxeles en el conjunto). Por ejemplo, la intensidad promedio para el subconjunto de píxeles con las intensidades más altas puede corresponder al promedio de las intensidades de píxeles mayores n para una fila particular de píxeles en una

imagen. La intensidad promedio para el subconjunto de píxeles con las intensidades más bajas puede corresponder al promedio de las intensidades de píxeles más pequeñas m para la fila particular. Los valores de n y m pueden ser diferentes, o los mismos. Por ejemplo, n puede tener un valor de 10, pero puede variar desde 1 hasta el número total de píxeles de la fila. Además, m puede tener un valor de 10, pero puede variar desde 1 hasta el número total de píxeles de la fila. Típicamente, los valores de n y m se seleccionan para el conjunto de píxeles de modo que ninguno de los píxeles seleccionados sea común tanto a los primer como segundo subconjuntos.

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

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

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

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la presente invención, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

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

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

25 Se puede usar una variedad de procedimientos diferentes para preparar muestras de manera automatizada para su posterior análisis. Para mejorar la uniformidad, una cantidad conocida de una muestra de líquido (por ejemplo, líquidos, suspensiones, soluciones y otras mezclas tales como sangre humana o animal o líquidos corporales, con o sin diluyente, por ejemplo, células de la médula ósea, orina, tejido vaginal, el tejido epitelial, tumores, semen, saliva y otros líquidos corporales) se puede distribuir sobre una superficie del sustrato de manera controlada para garantizar que el líquido no se acumule o se disperse escasamente en localizaciones particulares de la superficie del sustrato (por ejemplo, para lograr, lo máximo posible, uniformidad en la muestra depositada sobre el sustrato). A modo de ejemplo, el siguiente análisis se refiere a la dispersión y análisis de muestras de sangre en portaobjetos. Sin embargo, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento se pueden aplicar a la preparación y análisis de una amplia variedad de muestras de líquido, como se describe anteriormente, en una amplia variedad de sustratos. Los sustratos pueden incluir, pero no se limitan a, portaobjetos de vidrio o plástico, portaobjetos de cerámica pulida o espejada, sustratos de metal pulido, plástico u otras películas flexibles para muestras y/o cualquier otro material reflectante que pueda soportar una muestra.

40 Sistemas y procedimientos de aplicación de muestras

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

En algunos modos de realización, cuando se distribuye sangre en un patrón en bustrofedón, el aplicador de muestras, situado a una determinada altura por encima de la superficie del sustrato, se desliza por toda la superficie de la muestra en filas sucesivas, distribuyendo un volumen continuo de sangre a medida que se mueve. A medida que las filas de sangre se secan sobre la superficie del sustrato, se fusionan para formar una película continua de sangre. La uniformidad de la película depende de la manera en que se distribuyan las filas de sangre sobre el sustrato. La tasa a la que se distribuye la sangre y los espacios o la superposición entre las filas sucesivas de sangre se eligen de modo que las filas adyacentes de sangre, cuando se dispersan lateralmente y se fusionan, formen una película con una distribución celular por todo el sustrato que sea lo más uniforme posible, por ejemplo, una célula en grosor. Idealmente, las células dentro de la película se depositan

con el grosor deseado sobre el sustrato lo más densamente posible mientras se mantiene un espacio invariable entre las células para minimizar la superposición o el contacto entre las células adyacentes (por ejemplo, una capa de células distribuidas uniformemente por toda la superficie del sustrato donde cada célula está separada de las células adyacentes por la mitad del grosor de la célula).

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

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

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

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

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

Dadas las limitaciones anteriores, los procedimientos y sistemas que pueden determinar la altura del aplicador de muestras por encima de la superficie superior del sustrato son importantes para garantizar que se puedan usar

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

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

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

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

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

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

La FIG. 2 muestra una vista ampliada del modo de realización de la FIG. 1A. En la FIG. 2 (como en la FIG. 1A), un aplicador de muestras 100 se sitúa a una altura h por encima de una superficie superior del sustrato 102. El líquido 104 - distribuido por el aplicador 100 - no se muestra en la FIG. 2 para mayor claridad. Un detector 106 captura los rayos de luz que emergen de múltiples puntos en el aplicador de muestras 100. A modo de ilustración, se muestra una serie de rayos de luz que emergen del punto 100a sobre la superficie del aplicador de muestras

100. Los rayos 110a, 110b y 110c emergen del punto 100a y son detectados directamente por el detector 106; estos rayos forman una imagen directa (por ejemplo, no reflejada) del punto 100a. En una imagen formada en el detector 106, los rayos 110a-c forman una parte de una región de imagen directa que corresponde a la imagen directa del aplicador 100.

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

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

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

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

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

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

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

A continuación, en la etapa 404, cada subconjunto (por ejemplo, columna) de píxeles identificados en la etapa 402 se analiza por separado calculando un gradiente de intensidad a lo largo de la columna. En determinados modos de realización, el gradiente se calcula a lo largo de la columna de píxeles usando un núcleo de detección de bordes (por ejemplo, un núcleo de cuatro píxeles de [1, 3, -3, -1]). En algunos modos de realización, el gradiente se puede calcular determinando las diferencias de intensidad entre cada píxel adyacente en la columna. El cambio de intensidad ΔI entre dos píxeles adyacentes 1 y 2 se calcula como $\Delta I = I(2) - I(1)$, donde $I(1)$ e $I(2)$ son las intensidades medidas de los píxeles 1 y 2, respectivamente. Este procedimiento se ilustra en la FIG. 5B

para la columna de píxeles 506, donde el cambio de intensidad se representa a lo largo del eje superior (horizontal) con respecto a la posición de la columna en el eje izquierdo (vertical). Por ejemplo, el punto representado más arriba 514 a lo largo del eje vertical corresponde al cambio de intensidad entre el primer píxel 516 y el segundo píxel 518 en la columna 506. La coordenada vertical del punto 514 corresponde a la línea divisoria entre los píxeles; la coordenada horizontal del punto 514 corresponde al cambio de intensidad calculado entre los píxeles. Como la intensidad del segundo píxel 518 en la columna 506 es mayor que la intensidad del primer píxel 516 (por ejemplo, el segundo píxel aparece más brillante que el primero), el cambio de intensidad es positivo. Como es evidente a partir de la FIG. 5B, el mayor cambio de intensidad en la columna 506 se produce entre el cuarto píxel 520 y el quinto píxel 522; este cambio de intensidad está representado por el punto 524 en la FIG. 5B.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En determinados modos de realización, las filas de píxeles también se pueden acortar para acelerar las operaciones computacionales. Por ejemplo, en referencia a la FIG. 7A, las posiciones del borde de la imagen directa del aplicador de muestras se pueden determinar a partir del análisis de la imagen 704. Se puede suponer que las posiciones del borde de las imágenes reflejadas 708 y 710 del aplicador de muestras se encuentran aproximadamente en las mismas localizaciones que las posiciones del borde de la imagen directa 704. En consecuencia, las filas de píxeles que se usan para encontrar la posición del vértice de la imagen reflejada del aplicador de muestras se pueden acortar aplicando delimitadores del borde 714 y 716 en la FIG. 7A. Además, se pueden seleccionar delimitadores del borde para excluir otros rasgos característicos del sustrato (por ejemplo, logotipos pintados, marcos de muestras, marcas fiduciarias) de la primera región de imagen reflejada. Los delimitadores del borde 714 y 716 pueden estar en ángulo con respecto al eje central 108 como se muestra en la FIG. 7A, o pueden ser paralelos al eje central 108. El ángulo de los delimitadores del borde con respecto al eje central 108 puede ser 5° o más (por ejemplo, 10° o más, 15° o más, 20° o más, 25° o más, 30° o más, 40° o más, 50° o más).

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

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

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

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

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

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

Determinación de la altura del aplicador

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

Calibración - Consideraciones generales

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

Calibración de la detección táctil de la superficie

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

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

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

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

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

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

A modo de ejemplo, el procedimiento de calibración de detección táctil de superficie anterior se puede realizar en la inicialización de un sistema automatizado de preparación de muestras, en momentos predeterminados durante el funcionamiento normal o el mantenimiento de dicho sistema, o al recibir un mensaje de error del sistema

relacionado con la calidad de una muestra preparada sobre un sustrato (por ejemplo, una estación de imágenes de baja o alta ampliación no puede identificar o contar con exactitud uno o más componentes dentro de una muestra).

5 **Determinación del grosor del sustrato**

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

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

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

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

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

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

En los procedimientos divulgados anteriormente para determinar la separación μh , el aplicador de muestras 100 permanece tanto a una altura fija como a una localización fija con respecto al sustrato 102. Sin embargo, como se analiza anteriormente, la experimentación cuidadosa ha determinado alturas adecuadas para distribuir determinados líquidos sobre determinados sustratos. En particular, se ha determinado que para distribuir sangre sobre portaobjetos para formar una película que tiene aproximadamente un grosor de una célula, el aplicador de muestras 100 se debe mantener a una altura de aproximadamente 12 micrómetros por encima de la superficie

del portaobjetos. Este valor de altura se determinó para una tasa específica de distribución de muestra (por ejemplo, tasa de traslación del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102) y para una viscosidad de muestra específica. Más en general, el aplicador de muestras 100 se debe mantener a una altura de entre 8 micrómetros y 20 micrómetros por encima de la superficie del portaobjetos (por ejemplo, a una altura de aproximadamente 8 micrómetros, aproximadamente 10 micrómetros, aproximadamente 12 micrómetros, aproximadamente 14 micrómetros, aproximadamente 16 micrómetros, o aproximadamente 18 micrómetros, o dentro de un intervalo de 10 a 14, 16, o 18 micrómetros) cuando se distribuye sangre sobre portaobjetos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A partir de la información de calibración previamente determinada, se sabe que la separación objetivo μh_t corresponde a la altura objetivo h_t deseada del aplicador de muestras 100 por encima del sustrato 102. Por ejemplo, para distribuir una muestra de sangre en un portaobjetos, las etapas de calibración previas han determinado que la altura del aplicador de muestras objetivo h_t por encima de la superficie del sustrato 102 (por

ejemplo, 12 micrómetros) corresponde a una posición particular de la coordenada z del manipulador 150 (o fase 152). Como se muestra en la FIG. 8, la separación objetivo μh_t se encuentra entre las separaciones μh_3 y μh_4 medidas, que corresponden a las configuraciones de control de manipulador (o fase) V_3 y V_4 , respectivamente.

5 Para determinar la configuración de control de manipulador (o fase) que proporciona la altura del aplicador de muestras objetivo h_t (por ejemplo, 12 micrómetros), se puede usar la interpolación entre los puntos medidos ($V, \mu h$). En particular, la interpolación entre puntos ($V_3, \mu h_3$) y ($V_4, \mu h_4$) se puede usar para determinar la configuración de control V_t que proporciona la separación objetivo μh_t . Como la separación objetivo μh_t corresponde a la altura del aplicador objetivo h_t , la configuración de control V_t aplicada al manipulador 150 (o fase 152) proporciona la altura del aplicador de muestras objetivo h_t deseada.

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

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

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

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

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

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

60 **Determinación de la orientación del sustrato**

65 En algunos modos de realización, se puede determinar la orientación del sustrato 102. Con referencia a la FIG. 1B, determinar la orientación del sustrato 102 puede incluir determinar el ángulo de inclinación θ entre el plano definido por el sustrato 102 y un plano ortogonal al eje central 108 del aplicador de muestras 100. La determinación de la orientación del sustrato 102 también puede incluir la determinación de parámetros asociados

con una ecuación $f(x, y)$ que describe la superficie superior 102a del sustrato 102 como una función de la posición en el plano de coordenadas (x,y) del manipulador 150 (o fase 152). En general, la orientación de un plano se puede determinar cuando son conocidos tres puntos en el plano. En consecuencia, cuando el número de configuraciones de control almacenadas (que típicamente corresponde al número de localizaciones distintas del aplicador de muestras 100 con respecto al sustrato 102 en el que se determinan las configuraciones de control) es de tres o más, se puede determinar la ecuación del plano que describe la superficie 102a directamente desde la configuración de control almacenada. En algunos modos de realización, las configuraciones de control almacenadas se convierten en primer lugar en valores de desplazamiento expresados en unidades lineales (por ejemplo, micrómetros) usando información de calibración, y a continuación los valores de desplazamiento se usan para determinar los coeficientes de la ecuación del plano de la superficie 102a. Se ha observado que, como resultado de la pendiente del plano del sustrato 102 soportado por la fase 152, la coordenada vertical de la superficie 102a del sustrato (en el sistema de coordenadas del manipulador 150 o fase 152) puede variar en tanto como 30 micrómetros entre localizaciones en (x,y) en extremos opuestos del sustrato. La ecuación del plano que describe la superficie 102a también se puede usar, por ejemplo, para determinar el ángulo de inclinación de la superficie 102a. Además, con cuatro o más configuraciones de control almacenadas, es posible rastrear sustratos de superficie no planos, tal como un sustrato ligeramente curvado, ajustando una ecuación más compleja $f(x,y)$ que describe una superficie curva con respecto a los valores de las configuraciones de control. Los procedimientos para determinar una ecuación de un plano que describe o es relativo a una superficie se encuentran en la solicitud de patente de EE. UU. en tramitación n.º 13/019,118, presentada el 1 de febrero de 2011, ahora publicada como el documento US 2012/194729 A1.

Componentes del sistema

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

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

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

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

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

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

muestras 100 a lo largo de la dirección de la coordenada z del manipulador 150 a una nueva altura por encima del sustrato 102, y puede transmitir señales de control a la fase 152 para trasladar el sustrato 102 (por ejemplo, mientras el aplicador de muestras 100 permanece estacionario) para cambiar la altura del aplicador 100 por encima del sustrato 102.

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

Sistemas automatizados de preparación de muestras

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

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

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

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

Como se analiza anteriormente, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento permiten la determinación del grosor del sustrato 102 en base a imágenes del aplicador de muestras que se reflejan desde la superficie inferior 102b del sustrato. Esta información del grosor se puede usar por el subsistema de depósito de muestras 1020. Por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. n.º de serie 13/293,050 (ahora publicada como documento US 2012/0149050 A1), la información del grosor del sustrato se puede usar para determinar cómo orientar el sustrato en una posición de procesamiento de muestras y el grado de agitación que se produce durante el procedimiento de depósito.

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

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

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

Implementación de un equipo informático y un programa informático

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

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

OTROS MODOS DE REALIZACIÓN

Se ha descrito una serie de modos de realización. No obstante, se entenderá que se pueden hacer diversas modificaciones sin apartarse del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para situar un aplicador de muestras (100) con respecto a un sustrato (102), comprendiendo el procedimiento:
- 5 obtener una imagen (300) del aplicador de muestras (100) cerca del sustrato (102), comprendiendo la imagen (300) una región de imagen directa (702) correspondiente al aplicador de muestras (100) y una primera región de imagen reflejada (706) correspondiente a una imagen del aplicador de muestras (100) reflejada desde una superficie del sustrato (102); caracterizado por:
- 10 determinar una posición de un borde del aplicador de muestras (100) en la región de imagen directa (702);
- determinar una posición de un borde reflejado del aplicador de muestras (100) en la primera región de imagen reflejada (706);
- 15 determinar una distancia entre el borde del aplicador de muestras (100) y el borde reflejado del aplicador de muestras (100); y
- 20 determinar la posición del aplicador de muestras (100) con respecto al sustrato (102) en base a la distancia entre los bordes.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la posición del aplicador de muestras con respecto al sustrato comprende una altura del aplicador de muestras por encima de la superficie del sustrato, y en el que determinar la altura del aplicador de muestras por encima de la superficie del sustrato comprende calcular la
- 25 altura en base a información de referencia que comprende información de correlación que relaciona la distancia entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras con la altura.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, que comprende además medir un conjunto de distancias entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras, en el que medir cada miembro del conjunto de distancias comprende:
- 30 trasladar el aplicador de muestras a una nueva altura por encima de la superficie del sustrato;
- obtener una segunda imagen del aplicador de muestras a la nueva altura cerca del sustrato, comprendiendo la segunda imagen una región de imagen directa correspondiente al aplicador de muestras y una primera región de imagen reflejada correspondiente a una imagen del aplicador de muestras reflejada desde la superficie del sustrato;
- 35 determinar una posición de un borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa de la segunda imagen;
- determinar una posición de un borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada de la segunda imagen; y
- 40 determinar una distancia entre el borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa y el borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada de la segunda imagen.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende además:
- 50 determinar una configuración de control asociada con una posición objetivo del aplicador de muestras por interpolación entre distancias en el conjunto de distancias medido; y
- almacenar en una unidad de almacenamiento la configuración de control e información sobre una localización del aplicador de muestras con respecto al sustrato.
- 55 5. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende además:
- trasladar el aplicador de muestras en una dirección perpendicular a un eje central del aplicador a una nueva localización con respecto al sustrato;
- 60 medir un conjunto de distancias entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras;
- determinar una configuración de control asociada con una posición objetivo del aplicador de muestras en la nueva localización; y
- 65

almacenar la configuración de control e información sobre la nueva localización en la unidad de almacenamiento.

5 6. El procedimiento de la reivindicación 5, que comprende además repetir las etapas de trasladar el aplicador de muestras en una dirección perpendicular al eje central del aplicador de muestras a una nueva localización con respecto al sustrato, medir un conjunto de distancias entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras, determinar una configuración de control asociada con una posición objetivo del aplicador de muestras en la nueva localización, y almacenar la configuración de control e información sobre la nueva localización en la unidad de almacenamiento, hasta que un número de localizaciones sobre las que se almacena información sea de tres o más.

10 7. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende además determinar una orientación del sustrato con respecto a un plano perpendicular al eje central del aplicador de muestras, en el que determinar la orientación del sustrato comprende determinar una pendiente de la superficie del sustrato con respecto al plano perpendicular al eje central del aplicador de muestras.

15 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que determinar una posición de un borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa comprende:

20 seleccionar columnas de píxeles en la región de imagen directa que se extienden en una dirección paralela a un eje central del aplicador de muestras;

para cada columna seleccionada, determinar una posición del cambio de intensidad máximo dentro de la columna;

25 determinar la posición del borde del aplicador de muestras en base a las posiciones del cambio de intensidad máximo en cada columna seleccionada de píxeles.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que determinar la posición del cambio de intensidad máximo dentro de cada columna seleccionada comprende:

30 para cada par de píxeles adyacentes en la columna seleccionada, determinar un cambio de intensidad;

determinar un cambio de intensidad máximo entre pares de píxeles adyacentes en la columna seleccionada; y

35 ajustar una forma funcional al cambio de intensidad máximo entre pares de píxeles adyacentes para determinar la posición del cambio de intensidad máximo dentro de la columna seleccionada.

40 10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que determinar la posición del borde del aplicador de muestras comprende ajustar las posiciones de cambio de intensidad máximo dentro de cada columna seleccionada a una forma funcional.

45 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que determinar la posición del borde del aplicador de muestras comprende determinar un punto del vértice del aplicador de muestras en base a la forma funcional ajustada.

12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que determinar la posición del borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada comprende:

50 seleccionar filas de píxeles en la primera región de imagen reflejada que se extienden en una dirección perpendicular a un eje alargado de la imagen del aplicador de muestras;

para cada fila seleccionada, determinar un promedio de intensidades de píxeles más altas m en la fila, y determinar un promedio de intensidades de píxeles más bajas k en la fila;

55 determinar un nivel de contraste asociado con la fila como una diferencia entre el promedio de intensidades de píxeles más altas m y el promedio de intensidades de píxeles más bajas k ; y

determinar la posición del borde reflejado del aplicador de muestras en base al nivel de contraste en cada fila seleccionada.

60 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que determinar la posición del borde reflejado del aplicador de muestras en base al nivel de contraste en cada fila seleccionada comprende:

65 identificar una primera parte de la primera región de imagen reflejada en base a un nivel de contraste en cada fila de píxeles seleccionada, en el que la primera parte no comprende la imagen del aplicador de muestras;

identificar una segunda parte de la primera región de imagen reflejada en base a un nivel de contraste en cada fila de píxeles seleccionada, en el que la segunda parte comprende la imagen del aplicador de muestras; y

5 determinar la posición del borde reflejado del aplicador de muestras en base a una diferencia en los niveles de contraste entre las primera y segunda partes de la primera región de imagen reflejada.

10 14. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que m corresponde a al menos una quinta parte de un número total de píxeles en cada fila seleccionada, k corresponde a al menos una quinta parte del número total de píxeles en cada fila seleccionada, y en el que ningún píxel en cada fila seleccionada es común a los píxeles m y los píxeles k .

15 15. El procedimiento de la reivindicación 2, que comprende además calibrar la información de correlación, en el que calibrar la información de correlación comprende:

15 determinar un valor de señal de control de desplazamiento que provoca que un actuador del aplicador de muestras proporcione una fuerza ascendente que solo se superará por la fuerza de la gravedad;

almacenar el valor de señal de control de desplazamiento;

20 20 trasladar el aplicador de muestras hacia el sustrato hasta que una señal asociada con un error de traslación del actuador esté dentro de un umbral de error; y

almacenar la posición del aplicador de muestras cuando la señal asociada con el error de traslación del actuador esté dentro del umbral de error.

25 16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que calibrar la información de correlación comprende configurar la altura del aplicador de muestras a cero en la posición almacenada.

30 17. Un sistema (50), que comprende:

un aplicador de muestras (100);

una fase (152) configurada para soportar un sustrato (102);

35 un detector (106); y

un procesador electrónico (162), en el que el sistema está configurado de modo que cuando un sustrato (102) se soporta por la fase (152):

40 40 el detector (106) está configurado para obtener una imagen (300) del aplicador de muestras (100) cerca del sustrato (102), comprendiendo la imagen (300) una región de imagen directa (702) correspondiente al aplicador de muestras (100) y una primera región de imagen reflejada (706) correspondiente a una imagen (300) del aplicador de muestras (100) reflejada desde una superficie del sustrato (102); y **caracterizado por que** el procesador electrónico (162) está configurado para:

45 45 determinar una posición de un borde del aplicador de muestras (100) en la región de imagen directa (702);

determinar una posición de un borde reflejado del aplicador de muestras (100) en la primera región de imagen reflejada (706);

50 50 determinar una distancia entre el borde del aplicador de muestras (100) y el borde reflejado del aplicador de muestras (100); y

55 55 determinar la posición del aplicador de muestras (100) con respecto al sustrato (102) en base a la distancia entre los bordes.

60 18. El sistema de la reivindicación 17, en el que la posición del aplicador de muestras con respecto al sustrato comprende una altura del aplicador de muestras por encima de la superficie del sustrato, y en el que el procesador electrónico está configurado para determinar la altura del aplicador de muestras en base a información de referencia que comprende información de correlación que relaciona la distancia entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras con la altura.

65 19. El sistema de la reivindicación 18, en el que el procesador electrónico está configurado para medir un conjunto de distancias entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras:

trasladando el aplicador de muestras a una nueva altura por encima de la superficie del sustrato;

- 5 obteniendo una segunda imagen del aplicador de muestras a la nueva altura cerca del sustrato, comprendiendo la segunda imagen una región de imagen directa correspondiente al aplicador de muestras y una primera región de imagen reflejada correspondiente a una imagen del aplicador de muestras reflejada desde la superficie del sustrato;
- determinando una posición de un borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa de la segunda imagen;
- 10 determinando una posición de un borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada de la segunda imagen; y
- determinando una distancia entre el borde del aplicador de muestras en la región de imagen directa y el borde reflejado del aplicador de muestras en la primera región de imagen reflejada de la segunda imagen.
- 15 20. El sistema de la reivindicación 19, que comprende además una unidad de almacenamiento conectada al procesador electrónico, en el que el procesador electrónico está configurado para:
- determinar una configuración de control asociada con una posición objetivo del aplicador de muestras por interpolación entre distancias en el conjunto de distancias medido; y
- 20 almacenar la configuración de control e información sobre una localización del aplicador de muestras con respecto al sustrato en la unidad de almacenamiento.
- 25 21. El sistema de la reivindicación 20, en el que el procesador electrónico está configurado además para:
- trasladar el aplicador de muestras en una dirección perpendicular a un eje central del aplicador de muestras a una nueva localización con respecto al sustrato;
- 30 medir un conjunto de distancias entre el borde del aplicador de muestras y el borde reflejado del aplicador de muestras;
- determinar una configuración de control asociada con la posición objetivo del aplicador de muestras en la nueva localización; y
- 35 almacenar la configuración de control e información sobre la nueva localización en la unidad de almacenamiento.
22. Un procedimiento para determinar el grosor de un sustrato (102), comprendiendo el procedimiento:
- 40 obtener una imagen (300) de un aplicador de muestras (100) cerca del sustrato (102), comprendiendo la imagen una región de imagen directa (702) correspondiente al aplicador de muestras (100), una primera región de imagen reflejada (706) correspondiente a una imagen del aplicador de muestras (100) reflejada desde una superficie superior del sustrato (102) más cercana al aplicador de muestras, y
- 45 una segunda región de imagen reflejada (707) correspondiente a una imagen del aplicador de muestras (100) reflejada desde una superficie inferior del sustrato (102); caracterizado por:
- determinar una posición de un borde reflejado del aplicador de muestras (100) en la primera región de imagen reflejada (706);
- 50 determinar una posición de un borde reflejado del aplicador de muestras (100) en la segunda región de imagen reflejada (707);
- determinar una distancia entre los bordes reflejados del aplicador de muestras (100) en las primera y segunda regiones de imagen reflejada; y
- 55 determinar el grosor del sustrato (102) en base a la distancia entre los bordes reflejados del aplicador de muestras (100) en las primera y segunda regiones de imagen reflejada.
- 60 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que determinar el grosor del sustrato comprende calcular el grosor en base a información de referencia que comprende información de correlación que relaciona una distancia entre los bordes reflejados del aplicador de muestras con el grosor.

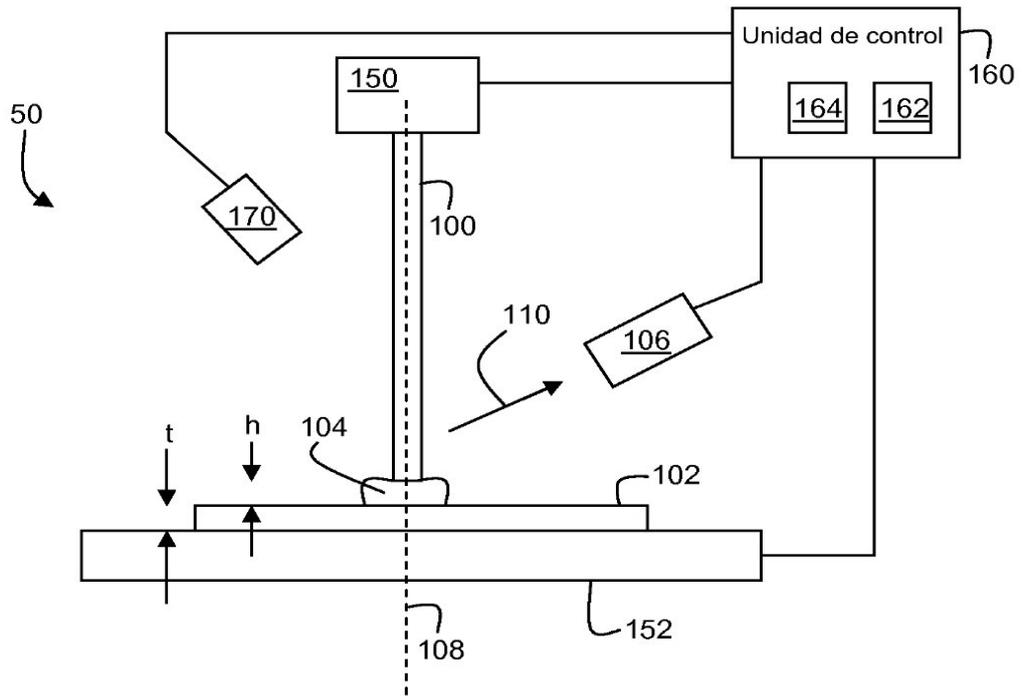


FIG. 1A

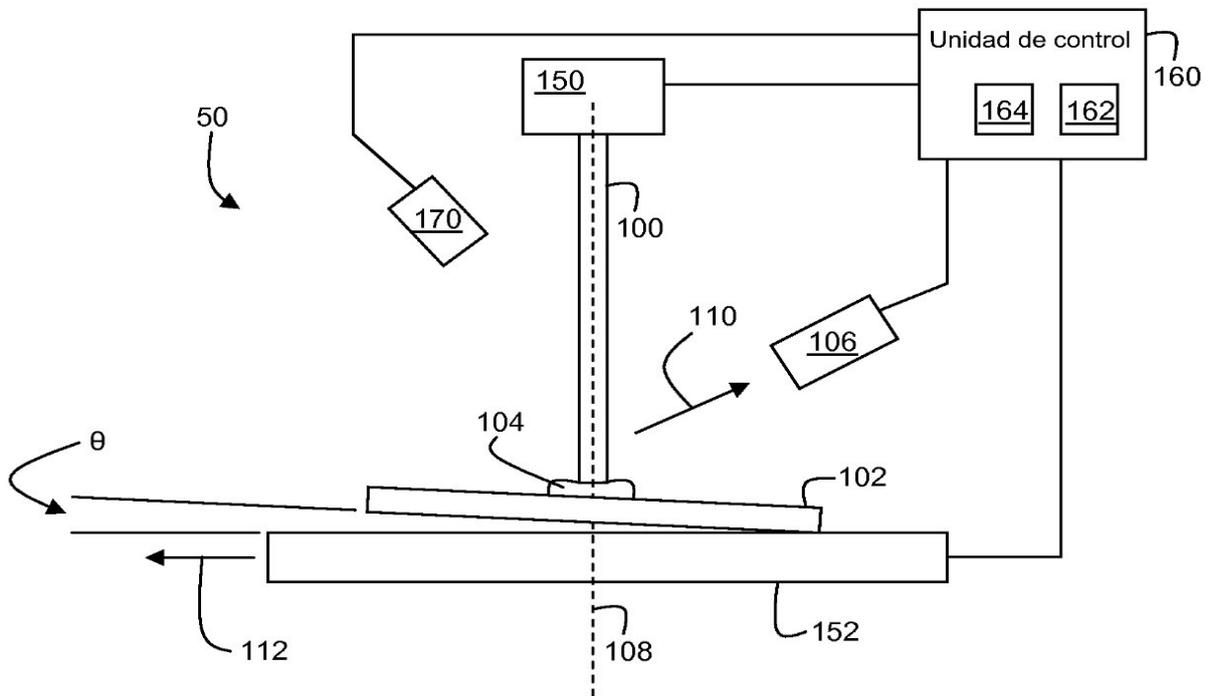


FIG. 1B

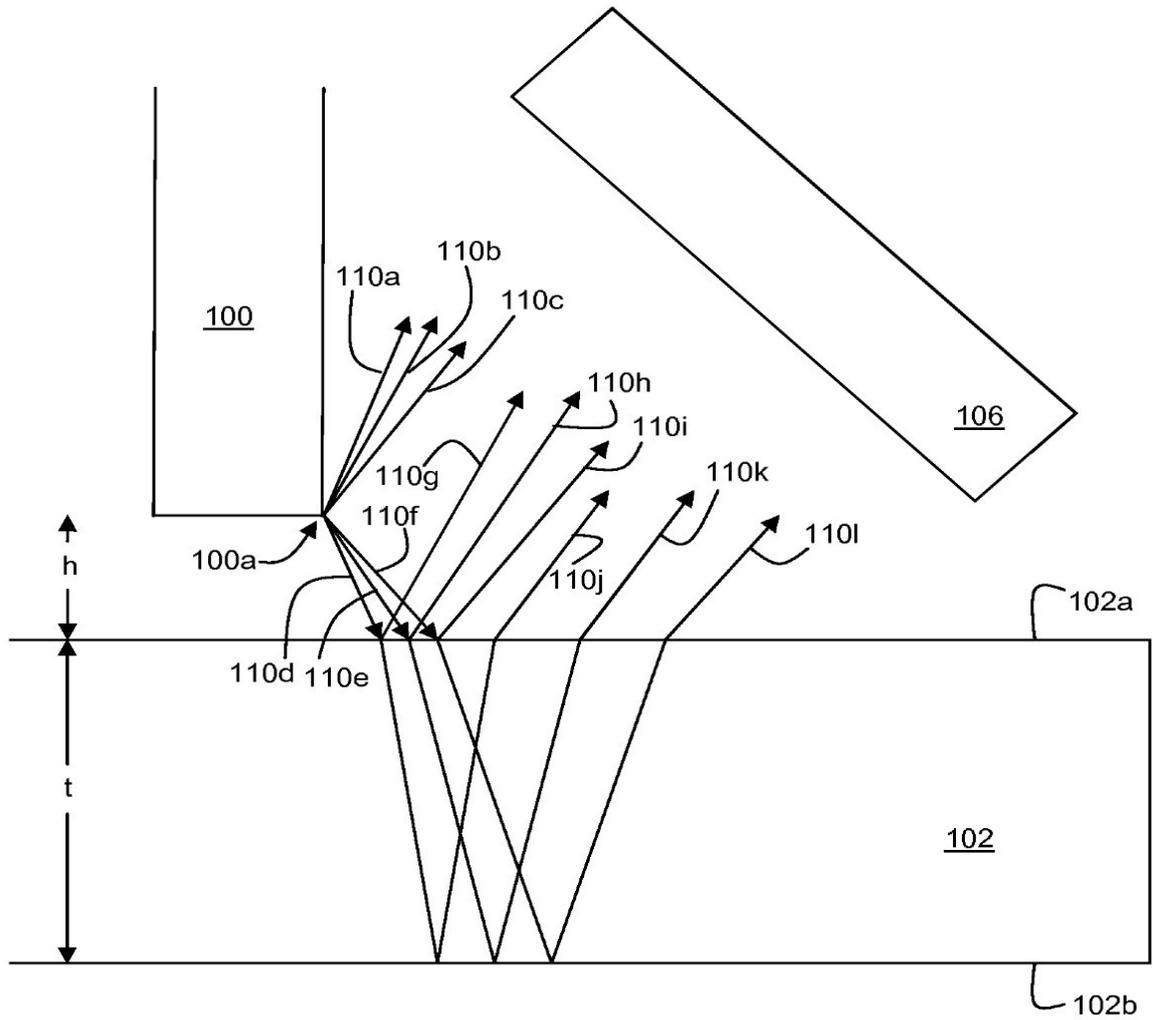


FIG. 2

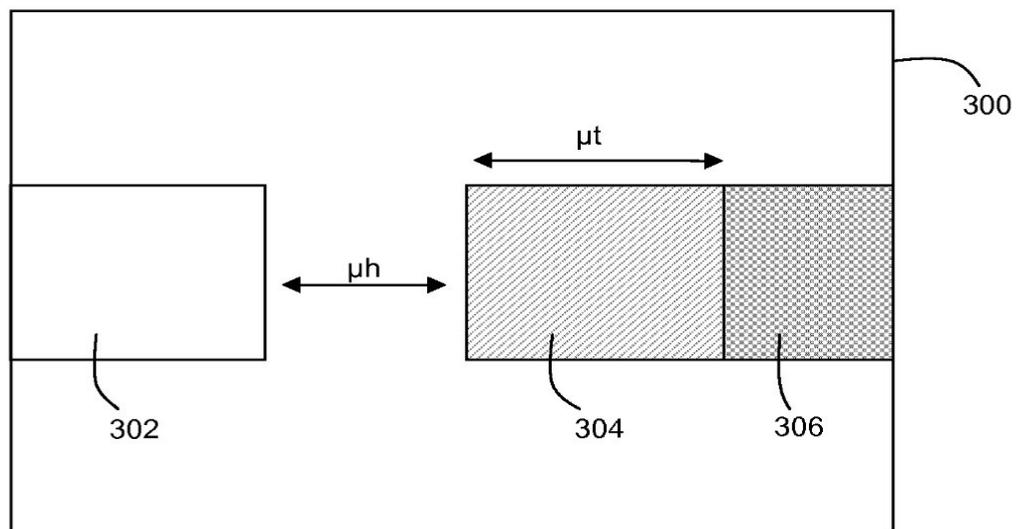


FIG. 3

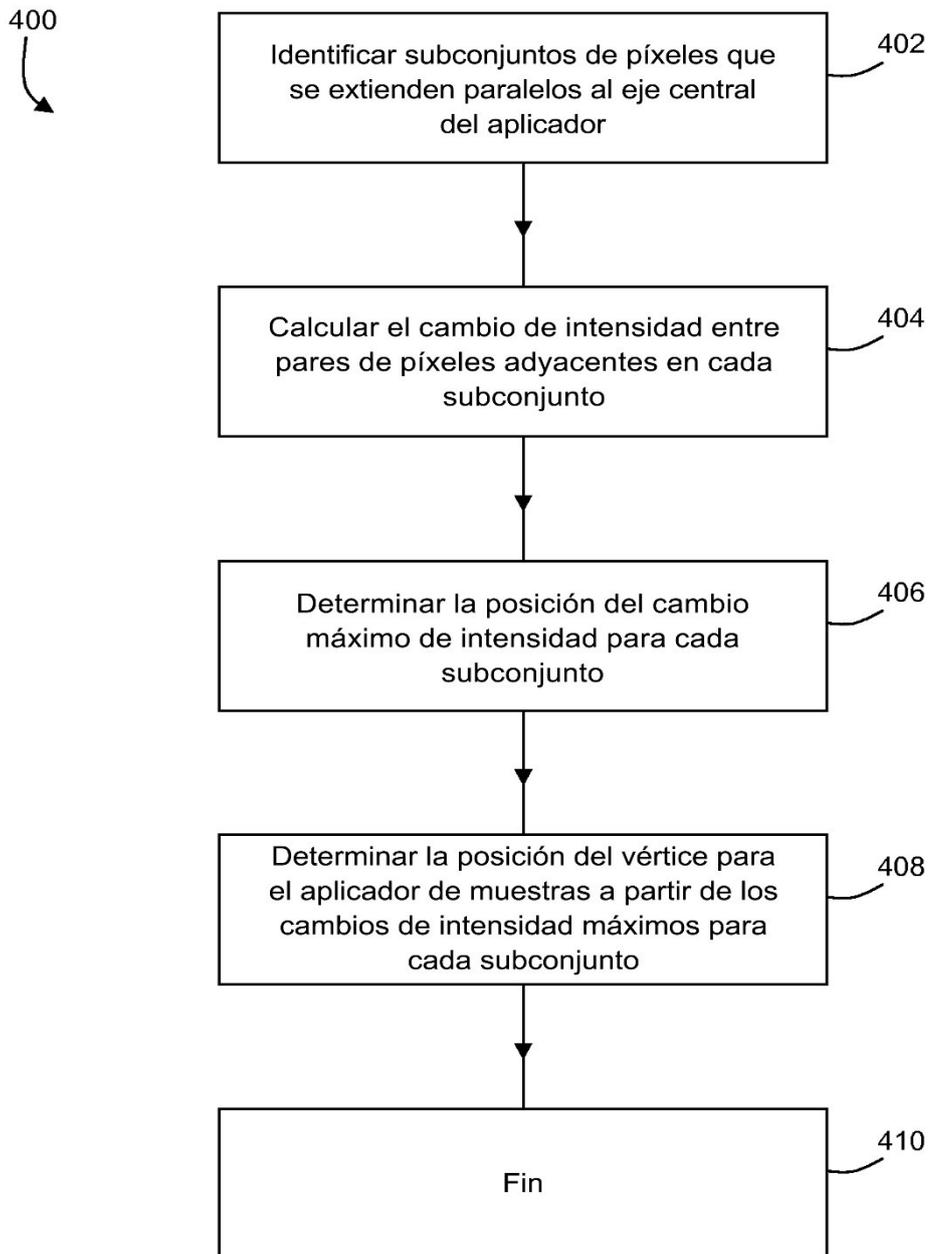


FIG. 4

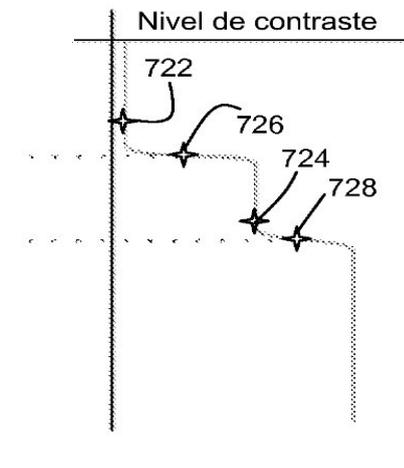
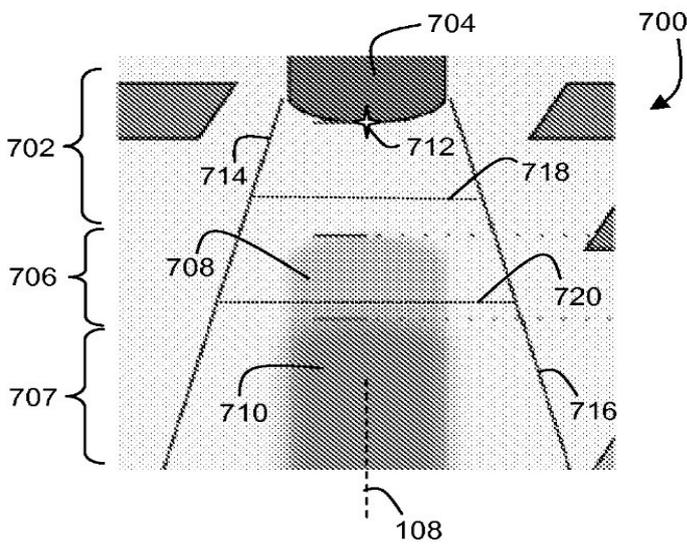
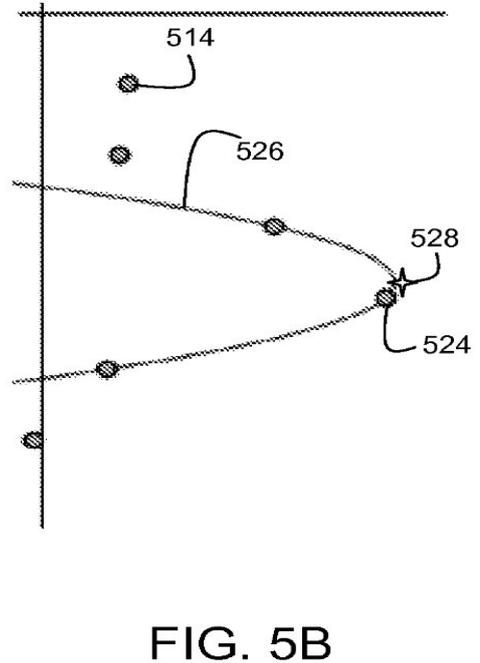
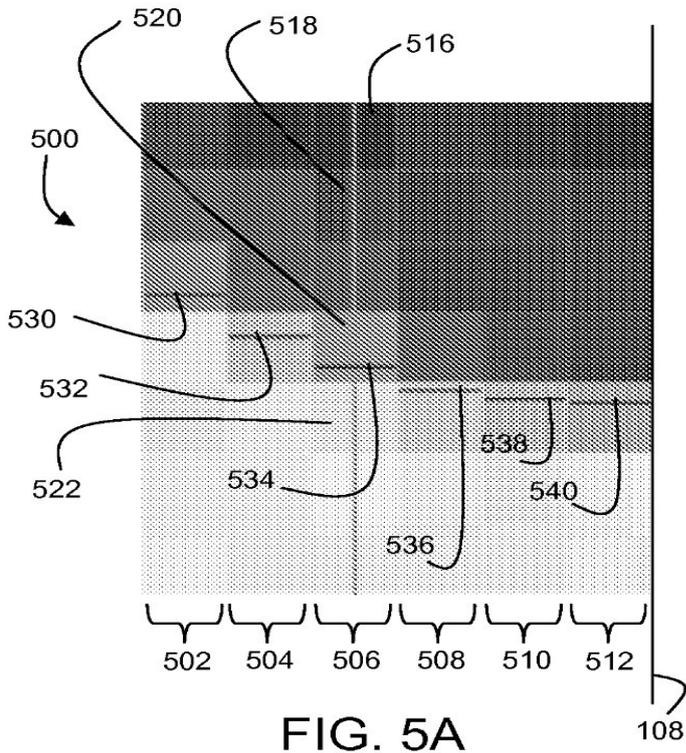


FIG. 7A

FIG. 7B

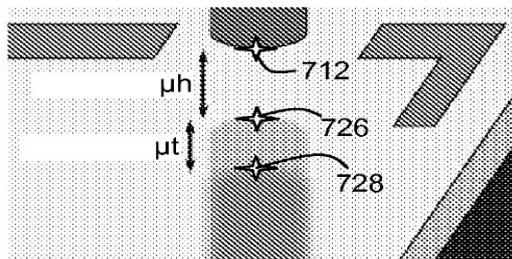


FIG. 7C

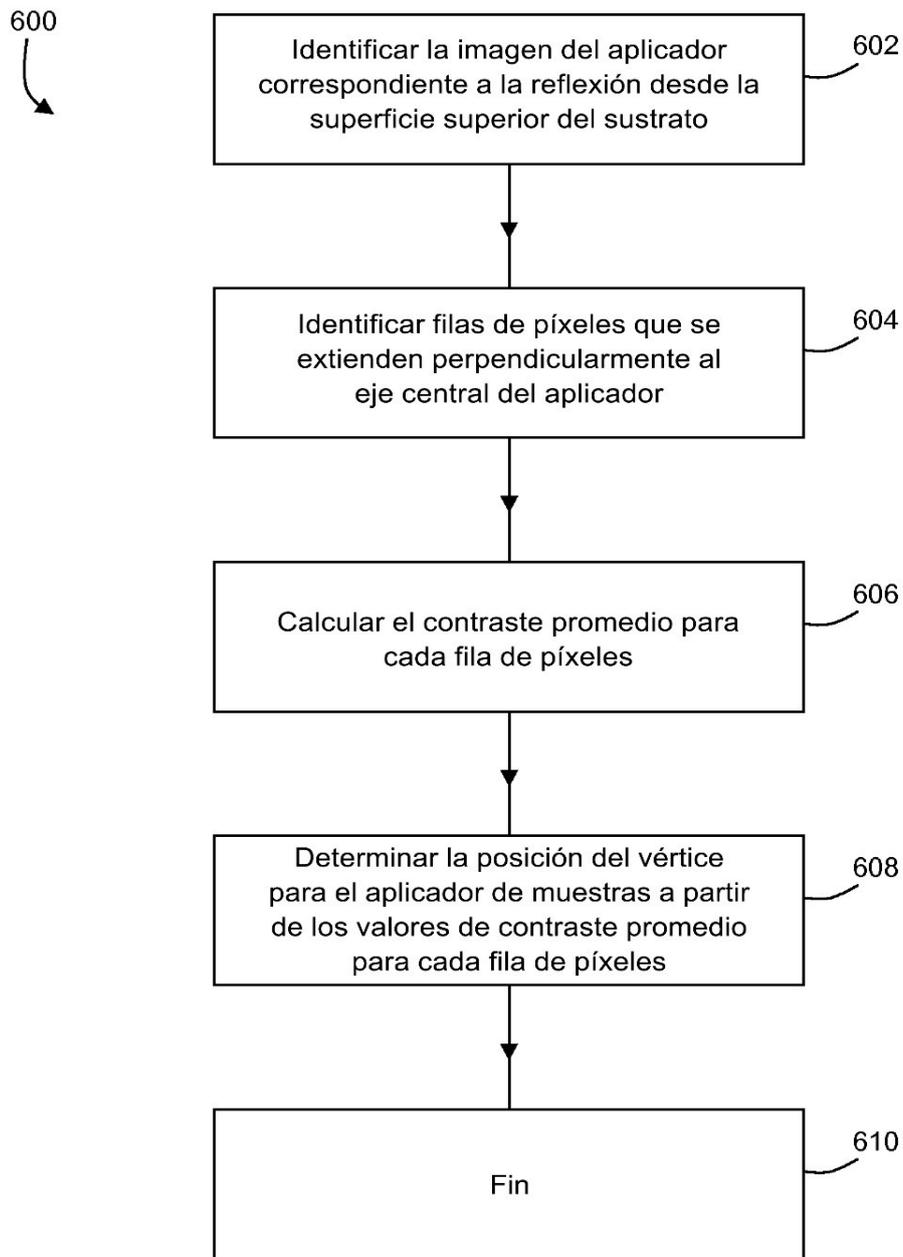


FIG. 6

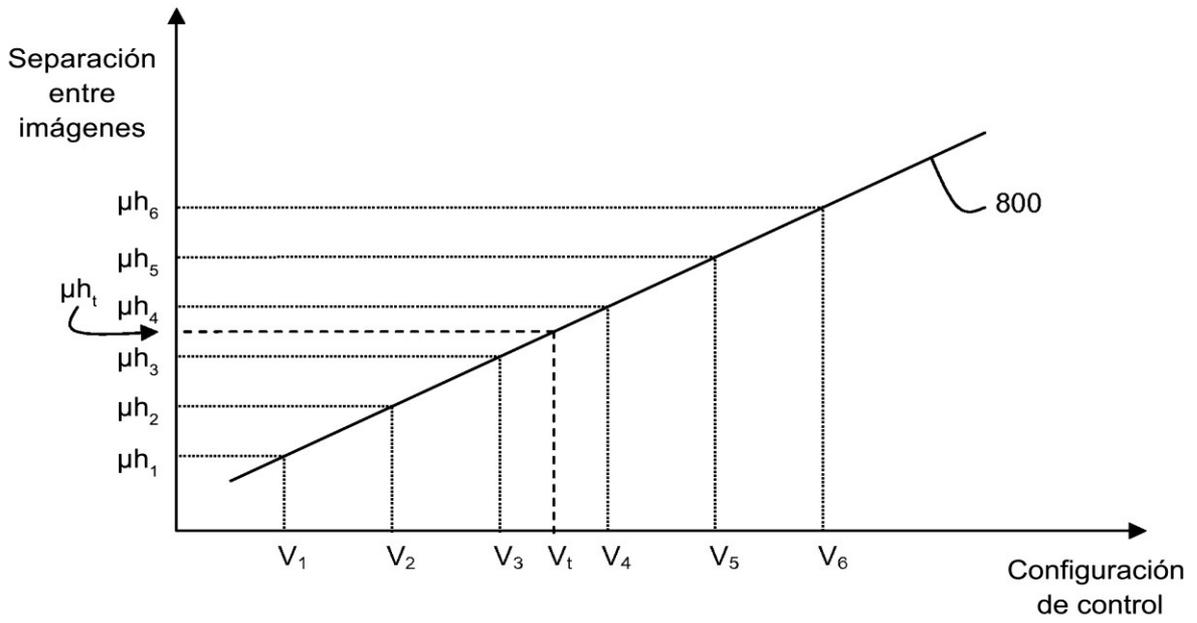


FIG. 8

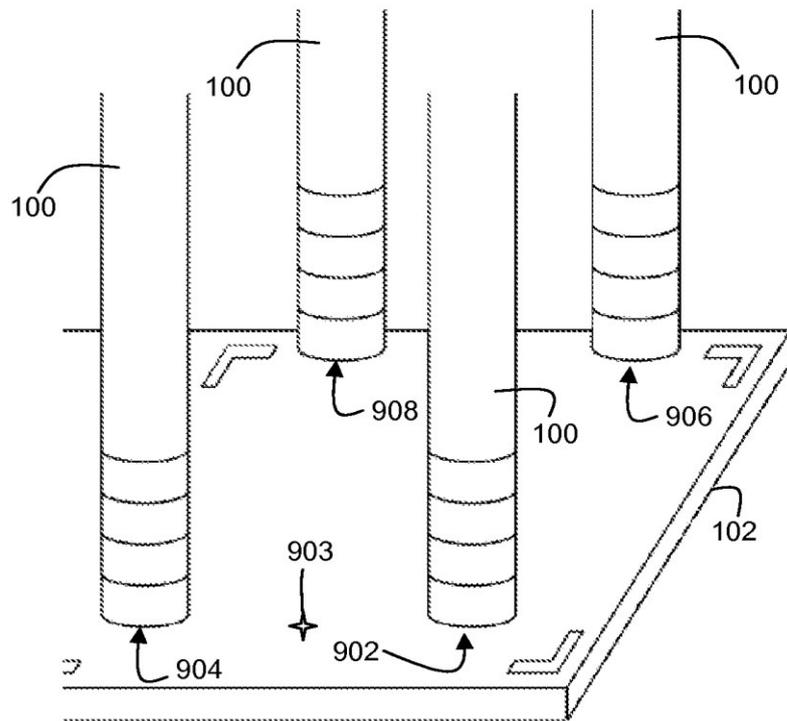


FIG. 9

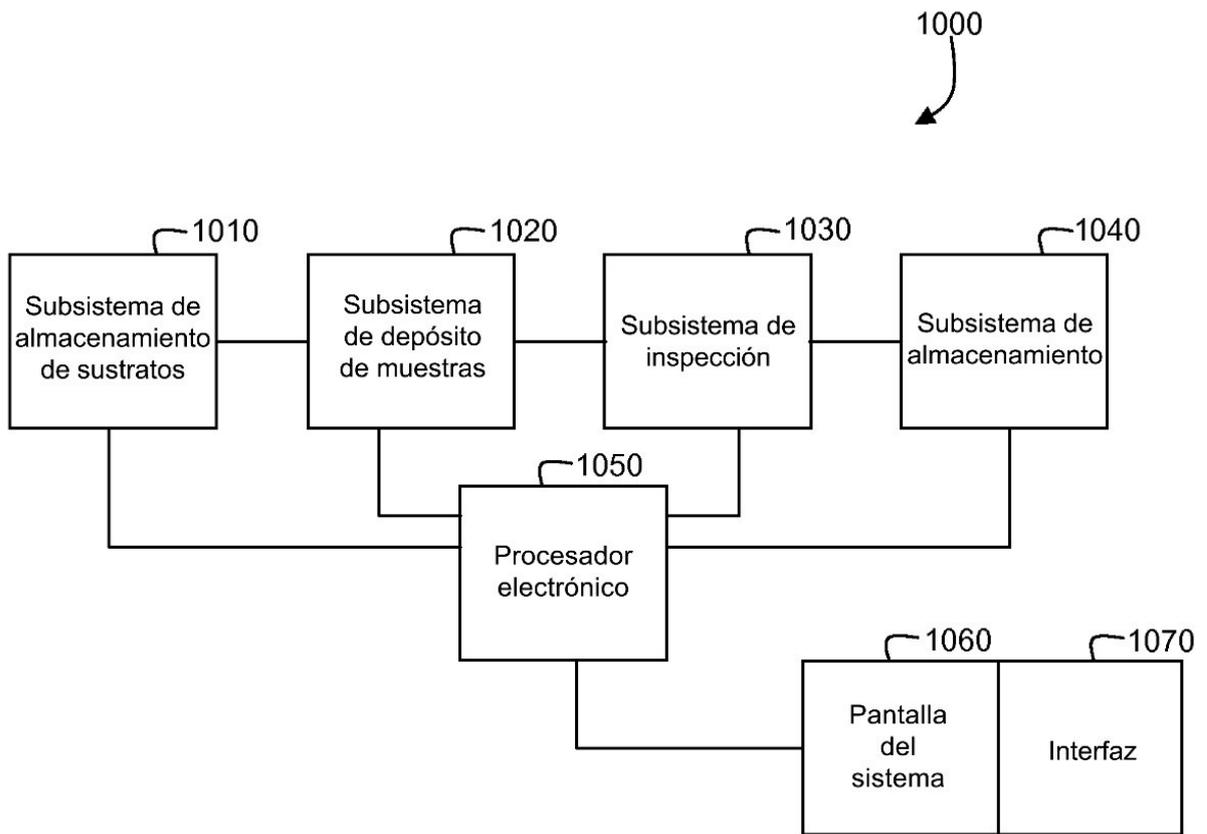


FIG. 10