

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 655**

51 Int. Cl.:

G01N 15/02	(2006.01)
G01N 15/14	(2006.01)
G01N 15/10	(2006.01)
C03B 23/04	(2006.01)
C03B 23/047	(2006.01)
C03B 23/057	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2009 PCT/US2009/064201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.05.2010 WO10056859**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2009 E 09826747 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 2356426**

54 Título: **Celdas de flujo óptico monolíticas y método de fabricación**

30 Prioridad:

14.11.2008 US 114544 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2020

73 Titular/es:

**BECKMAN COULTER, INC. (100.0%)
250 S. Kraemer Boulevard
Brea, CA 92821, US**

72 Inventor/es:

**GRAHAM, MARSHALL, DONNIE;
GRAHAM, WILLIAM, GERRY;
CLARKIN, JAMES, P.;
WELLS, MARK, A.;
CANO, JOSE, M.;
ARBOLEDA, CARLOS, ALBERTO y
SANCHEZ, ARMANDO, JOSE**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 796 655 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

Celdas de flujo óptico monolíticas y método de fabricación

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere de manera general a aparatos y a métodos para diferenciar tipos constituyentes de cuerpos formados (por ejemplo, células u otras partículas pequeñas) en muestras líquidas (por ejemplo, sangre completa u otros líquidos de suspensión de partículas). Más particularmente, esta invención se refiere a mejoras en celdas de flujo óptico del tipo habitualmente usado en citómetros de flujo (por ejemplo, instrumentos de citómetros de flujo de hematología y fluorescencia) que funcionan para detectar, diferenciar y caracterizar cuerpos formados mediante diversos medios de transducción óptica, preferiblemente en combinación con parámetros no ópticos adquiridos mediante el principio de Coulter. La invención se refiere además a mejoras en métodos para producir celdas de flujo óptico, mediante los cuales se proporciona un canal de flujo de sección transversal poligonal dentro de un elemento transparente monolítico.

20 **2. Discusión de la técnica anterior**

Resulta práctica habitual automatizar análisis de líquidos corporales de pacientes como ayuda en el diagnóstico del estado de salud de un paciente. Tales análisis incluyen normalmente hacer fluir una porción preparada de tales líquidos corporales a través de un transductor para derivar determinados parámetros característicos de varios tipos o subpoblaciones diferentes de cuerpos formados constituyentes en los mismos, diferenciar y enumerar los diversos tipos o subpoblaciones de los cuerpos formados basándose en los parámetros derivados, y procesar o correlacionar la información resultante para proporcionar diagnósticos deseados. Por ejemplo, estas tareas pueden lograrse para sangre completa mediante caracterización de células sanguíneas en la misma mediante citómetros de flujo y analizadores de hematología automatizados convencionales.

30 El límite de rendimiento fundamental de instrumentos del tipo indicado anteriormente se origina en la transducción de propiedades de cuerpos formados para dar los parámetros caracterizantes usados para asignar cuerpos formados individuales a subpoblaciones específicas. Para muchas aplicaciones, los métodos de transducción óptica solo proporcionan medios eficaces para caracterizar cuerpos formados. En estas aplicaciones, una porción de una muestra preparada se interroga con radiación óptica a medida que fluye a través de un canal formado en un elemento ópticamente transparente, o celda de flujo, que forma una porción de un transductor optoelectrónico. Fotodetectores adecuados, que también forman parte del transductor, están posicionados para detectar diversos parámetros ópticos a partir del cuerpo formado irradiado, incluyendo, por ejemplo, su absorbancia óptica del haz de interrogación, su fluorescencia a diferentes longitudes de onda y su efecto de dispersión de luz dentro de uno o más intervalos angulares. En estas aplicaciones sólo ópticas, se apreciará que el alcance físico del canal de celda de flujo puede ser relativamente grande sin afectar de manera adversa a la determinación de estos parámetros ópticos. Sin embargo, en otras aplicaciones de citometría en las que tales parámetros ópticos se combinan con parámetros no ópticos determinados de manera simultánea, en particular los basados en el principio de Coulter (comentado más adelante), la sección transversal y longitud del canal de celda de flujo deben restringirse drásticamente para lograr una intensidad de señal adecuada.

45 Debido a la baja sensibilidad de los métodos de detección óptica que existían entonces, W. H. Coulter diseñó un método electrónico para caracterizar cuerpos formados diminutos suspendidos en un líquido. El principio de Coulter bien conocido permite la determinación del volumen de cuerpos formados, haciendo fluir una porción de muestra preparada en un líquido eléctricamente conductor a través de un conducto de detección de partículas (o volúmetro) de manera simultánea con corriente eléctrica. La resistividad eléctrica del líquido de suspensión de partículas difiere de la de las partículas, permitiendo el contraste eléctrico contar y dimensionar partículas que transitan por el conducto de volúmetro. Aunque se comentaron otras geometrías en la patente estadounidense n.º 2.656.508 de Coulter, los conductos de volúmetro son habitualmente perforaciones cilíndricas en una oblea aislante delgada, determinando el área de la sección transversal y la longitud del conducto la sensibilidad volumétrica, volumen de coincidencia y dimensión máxima que puede pasar de cuerpos formados; por tanto, los diámetros de conducto son normalmente como máximo un orden de magnitud mayor que el diámetro de los cuerpos formados típicos que van a analizarse. El conducto de volúmetro forma la única comunicación de fluido entre dos cámaras aislantes, sin ningún requisito sobre las características ópticas del material de oblea que rodea el conducto. Normalmente, se proporciona una corriente continua (CC) a través del conducto, y se adquieren señales de volumen de Coulter resistivas (V) mediante un par de electrodos posicionados fuera de los extremos opuestos del conducto de volúmetro. Sin embargo, en la patente estadounidense n.º 3.502.974 concedida a W.H. Coulter y W. R. Hogg, se proporcionó una corriente de excitación que incluía al menos una corriente alterna (CA) a través del conducto, permitiendo así la determinación de las componentes no sólo resistiva sino también reactiva de la corriente de conducto resultante a partir de su modulación mediante el paso de un cuerpo formado. Cuando tales corrientes incluyen una que tiene una frecuencia en el intervalo de radiofrecuencia (RF) (por ejemplo, 23 MHz), las componentes respectivas permiten la estimación del volumen (V) y la conductividad eléctrica (C) de un cuerpo formado, y se dice que la razón de las

componentes reactivas frente a las resistivas es la "opacidad" del cuerpo formado.

En la patente estadounidense n.º 6.228.652 legalmente cedida (a continuación en el presente documento, la patente '652), se da a conocer un aparato que puede proporcionar adquisición simultánea de diversas señales ópticas, V de Coulter y C de Coulter a partir de un cuerpo formado individual, con posterior diferenciación de subpoblaciones de cuerpos formados en sangre completa basándose en las mismas. En la patente '652 la celda de flujo preferida comprende un elemento ópticamente transparente que tiene una envolvente exterior prismática de sección transversal cuadrada, que mide aproximadamente 4,2 mm en cada lado, y que tiene una longitud de aproximadamente 6,3 mm. (Tal como se usa en el presente documento, el término "prismático" se refiere a cualquier figura tridimensional compuesta por tres o más lados intersecantes que son planos, y un par de extremos opuestos que tienen forma poligonal. "Poligonal" se usa en el presente documento para hacer referencia a cualquier figura plana cerrada que tiene al menos tres lados sustancialmente rectos, y "plano" tal como se usa en el presente documento se refiere a una superficie que tiene un área que es predominantemente plana). Ubicado de manera central dentro de tal elemento prismático hay un conducto de volúmetro prismático que tiene una sección transversal cuadrada de aproximadamente 50 micrómetros en cada lado y una longitud de aproximadamente 65 micrómetros; la sección transversal y longitud relativamente pequeñas del conducto son necesarias para alcanzar una sensibilidad volumétrica y volumen de coincidencia razonables para adquirir dichas señales de V y C. Por tanto, la razón de las áreas de la sección transversal respectivas de dicho conducto y dicha envolvente es de aproximadamente 0,00014, y el grosor de pared es de aproximadamente 2,075 mm. Para limitar de manera aceptable el contenido de aberraciones de señales ópticas, las superficies de la envolvente prismática y el conducto deben ser sustancialmente paralelas, con planitud óptica. Esta combinación de geometrías en sección transversal cuadrada/cuadrada, grosor de pared, paralelismo de superficies de pared y planitud de pared es difícil de lograr.

Para fabricar celdas de flujo prismáticas del tipo descrito en la patente '652, se ha usado un procedimiento de planarización relativamente complejo en el que se pulen cuatro placas transparentes, por ejemplo, una forma de sílice (SiO₂, habitualmente denominado cuarzo), hasta un grosor predeterminado y se someten a acabado y se ensamblan tal como se muestra en la figura 13. Durante el ensamblaje, un par de dichas placas CC1 y CC3 se separa por el otro par CC2 y CC4 para formar dos paredes de celda 30 de flujo, estando el par de placas de separación de grosor igual separadas de manera apropiada una distancia predeterminada de modo que sus bordes opuestos completan un canal Z interno. Preferiblemente, estos elementos complementarios independientes tienen dimensiones apropiadas y se unen en sus superficies de contacto mediante una técnica de fusión para formar un vástago prismático que tiene un canal interno, recto, que se extiende longitudinalmente, con una sección transversal cuadrada deseada en el mismo. Después se corta este vástago hasta una longitud deseada, por ejemplo, de 6,3 mm, y se pule hasta la geometría y dimensiones externas deseadas para formar una celda de flujo que tiene una envolvente prismática, por ejemplo, lados 50 opuestos en la figura 13 que tienen una separación de parte plana a parte plana de 4,2 mm. Tales celdas de flujo que tienen canales de flujo prismáticos de sección longitudinal constante pero de diversas secciones transversales, tanto cuadradas como rectangulares, se han producido haciendo variar el grosor y la separación de las dos placas de separación que separan las dos ventanas. Se forma un conducto de volúmetro prismático, por ejemplo, el conducto cuadrado de 50 micrómetros por 50 micrómetros descrito anteriormente, en tales celdas de flujo perforando el canal cuadrado desde ambos extremos hasta un diámetro adecuado (por ejemplo, 1,25 mm), dejando *in situ* una longitud corta (por ejemplo, 65 micrómetros) del canal original en el centro de la celda de flujo que desemboca en cada extremo en un pequeño rebaje en forma de copa (por ejemplo, con un radio de aproximadamente 600 micrómetros) sustancialmente tangente a un cono de 90 grados coaxial con el canal original y continuo con las perforaciones de extremo. La sección de canal longitudinal resultante es de tal manera que el líquido de muestra en un líquido de protección de enfoque hidrodinámico pasa de manera central a través del conducto de volúmetro dentro de la celda de flujo. Otras realizaciones de celdas de flujo producidas mediante el procedimiento de planarización se han adaptado para funcionar en citómetros de flujo de fluorescencia tales como los analizadores para investigación XL y FC500, así como el clasificador celular Altra™, todos ellos producidos y comercializados por Beckman Coulter, Inc. (celdas de flujo de una sola pieza adecuadas para su aplicación en estos instrumentos y producidas mediante el método de la presente invención se ilustran respectivamente en las figuras 9, 10 y 11 y se comentarán como realizaciones).

Aunque se han producido celdas de flujo prismáticas útiles mediante el procedimiento de planarización anteriormente descrito, el rendimiento de celdas de flujo que funcionan de manera fiable procesadas para contener un conducto de volúmetro ha demostrado ser muy bajo, normalmente de menos de 1 de cada 3. Para cuerpos formados que transitan por el conducto Z de volúmetro interno de celdas de flujo útiles (por ejemplo, BC2 en la figura 13), las señales ópticas adquiridas a través de las dos ventanas pueden ser sustancialmente repetibles (por ejemplo, las señales de dispersión frontal (FS) resultantes de un sensor colocado fuera de la ventana CC1 y en el eje óptico OA opuesta a la ventana CC3 de entrada para el haz B de radiación en la figura 13). Sin embargo, las adquiridas a través de las dos paredes que comprenden placas de separación (por ejemplo, señal de fluorescencia (F) adquirida a través de CC2 y señal de dispersión lateral (SS) adquirida a través de CC4 en la figura 13) demuestran tanto sensibilidad frente a la posición de haz de excitación en casos individuales como variabilidad de unidad a unidad en las señales ópticas resultantes. De manera más importante, las celdas de flujo producidas mediante el procedimiento de planarización (por ejemplo, la celda 30 de flujo en la figura 13) son propensas a modos de fallo posteriores: en primer lugar, irregularidades y cavidades de aire en las uniones fusionadas características del enfoque de planarización dan como resultado calentamiento localizado debido a la componente de RF de la

corriente de excitación de conducto, con el consiguiente fallo de la unión; en segundo lugar, algunas celdas de flujo que demuestran longevidad con la exposición a RF muestran una variabilidad de unidad a unidad dependiente de la unión en las señales ópticas, aunque las uniones estén posicionadas simétricamente con respecto al eje de excitación óptica; en tercer lugar, las imperfecciones de uniones tienden a agrandarse cuando los flujos de muestra van acompañados por presión cíclica significativa; y finalmente, las celdas de flujo que se dejan en aparatos almacenados tienden a separarse a lo largo de las uniones debido a la cristalización de sales si se deja que se evaporen reactivos residuales.

También se han usado procedimientos de producción más complejos, en los que se ensamblan de manera apropiada diversos sólidos transparentes de geometría predeterminada, para producir celdas de flujo óptico que tienen conductos de volúmetro prismáticos de una geometría y dimensiones deseadas. La patente estadounidense n.º 4.348.107 legalmente cedida (a continuación en el presente documento, la patente '107) da a conocer celdas de flujo óptico en las que un conducto de volúmetro que tiene una sección transversal preferiblemente cuadrada está contenido dentro de una envolvente que tiene una superficie esférica exterior u otra superficie de revolución. (En las figuras 12A, 12B y 12C se ilustran celdas de flujo de una sola pieza que tienen esta envolvente, pero producidas mediante el método de la presente invención, y se comentarán como realizaciones). Tal como se ilustra en la patente '107, tales celdas de flujo se producen uniendo entre sí cuatro pirámides de base cuadrada, complementarias, truncadas, formadas de un material transparente (por ejemplo, cuarzo). El vértice en cada pirámide está pulido hasta una profundidad calculada para producir un lado del conducto de volúmetro deseado, y después se ensamblan de manera apropiada las pirámides y se unen de manera adhesiva entre sí de modo que los vértices truncados forman un conducto prismático cuadrado sin obstrucciones, formando las caras adyacentes de las pirámides unidas una sección longitudinal en sección decreciente en uno o ambos extremos del conducto. Aunque pueden adquirirse señales ópticas a través de las paredes planas de la envolvente prismática resultante, se prefiere que medios no especificados en la patente '107 doten entonces a la celda de flujo de una envolvente formada como superficie de revolución. Una extensión que permite el acoplamiento del líquido de muestra y un líquido de protección de enfoque hidrodinámico a través del conducto se sella a la celda de flujo resultante, en el punto en el que su superficie se interseca por una o ambas de las aproximaciones formadas por los lados expuestos de las cuatro pirámides. La patente '107 indica que las características ópticas y mecánicas de dicha estructura demostraron ser inferiores a las óptimas, presentando posiblemente fluorescencia las uniones adhesivas o separándose, pero no proporciona ningún método de unión alternativo. Una comparación teórica de las propiedades ópticas de la estructura de celda de flujo de la patente '107 idealizada con las de una celda de flujo que tiene una sección transversal cuadrada en una envolvente prismática cuadrada, se publicó en *Applied Optics* (26:3244-3248, 1987) por el inventor y uno de los presentes coinventores; no se describió ningún método para la producción de ninguna de las estructuras de celda de flujo. El inventor y otros colaboradores verificaron posteriormente algunas de esas predicciones teóricas en una segunda comparación (*Cytometry* 20:185-190, 1995) usando una realización de la celda de flujo de la patente '107 que tenía las cuatro pirámides fusionadas entre sí, evitando por tanto dichos problemas de unión adhesiva, y una celda de flujo cilíndrica monolítica tal como se usa en instrumentos de hematología automatizados fabricados y comercializados por Beckman Coulter, Inc. (comentado más adelante); la figura 2 en esta publicación muestra la celda de flujo de la patente '107 sellada, después de la producción de una envolvente exterior esférica pulida, entre extensiones de las cámaras de plástico que alojan electrodos que permiten la adquisición de señales de V y C de Coulter. Tal como se da a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 4.673.288 y 4.818.103, se han usado variaciones del enfoque dado a conocer en la patente '107 para proporcionar conductos de volúmetro prismáticos que tienen una sección transversal triangular en una envolvente de forma similar, diciéndose que estructuras cuadradas, de cinco lados, etc., están dentro del alcance de la invención. Para permitir la recogida eficiente mediante un objetivo de microscopio de señales ópticas a partir de tales conductos de volúmetro triangulares, en la solicitud de patente estadounidense 2007/0085997 se sitúa una placa transparente delgada (ventana) para una de las pirámides truncadas, completándose la envolvente mediante los dos componentes complementarios restantes modificados para facilitar la interrogación de cuerpos formados mediante radiación óptica a través de sus paredes; este enfoque se implementa en el citómetro Quanta™ comercializado por Beckman Coulter, Inc. Tal como se apreciará, se requieren múltiples uniones, sujetas a las mismas desventajas que las que se producen en el procedimiento de planarización anteriormente descrito, en celdas de flujo que incluyen una pluralidad de tales elementos fusionados. Además, las demandas de mecanizar los vértices a partir de múltiples elementos, ensamblar los elementos entre sí y unirlos para obtener conductos poligonales repetibles que tienen las dimensiones de conducto deseadas hacen que este enfoque sea tanto más costoso como incluso menos atractivo como procedimiento de producción. Este enfoque se vuelve cada vez más desventajoso a medida que aumenta el número de caras prismáticas.

En la caracterización de diversos tipos de cuerpos formados mediante técnicas citométricas, una necesidad recurrente es adquirir de manera simultánea varios tipos diferentes de señales ópticas resultantes de la interacción de los cuerpos formados con una o más fuentes de radiación, es decir, alguna combinación seleccionada de señales de fluorescencia (F) de múltiples longitudes de onda, señales de absorción (A) y señales de dispersión (S) tales como señales de dispersión frontal (FS), dispersión lateral (SS) o retrodispersión (BS); en tales aplicaciones, las cuatro caras externas en una celda de flujo prismática cuadrada/cuadrada requieren que una pluralidad de sensores vean una zona de interrogación a través de óptica compleja de división de haz y/o diferenciación de longitud de onda lo que, además de añadir coste, introduce dificultades de alineación y otras dificultades ópticas. Puede abordarse este problema añadiendo más caras a la envolvente y conducto de volúmetro prismáticos de la celda de flujo,

mediante lo cual tanto la envolvente como el conducto interno de celda de flujo pueden tener una sección transversal pentagonal, hexagonal, heptagonal, etc., de modo que cada medición óptica de interés puede realizarse a través de una cara independiente de la celda de flujo. Sin embargo, la fabricación de tales celdas de flujo prismáticas mediante cualquiera de las técnicas convencionales anteriormente indicadas será tan compleja y requerirá tanto tiempo que no resultará en absoluto práctica, especialmente si tales celdas de flujo tienen que producirse en números relativamente grandes para su incorporación en instrumentos citométricos comerciales.

En la técnica de elaboración del vidrio se conoce estirar tubos a partir de una preforma más grande de diversos diámetros internos y externos entre los cuales hay una pared cilíndrica de hasta varios centímetros de grosor. Durante la operación de estirado, se calienta la preforma hasta una temperatura predeterminada a la que su viscosidad permite la deformación, tras lo cual se estira axialmente, de manera habitual en una dirección verticalmente hacia abajo, a una tasa constante y predeterminada. Durante este procedimiento, los diámetros de las secciones transversales interna y externa de la preforma se reducen sustancialmente conservándose sustancialmente las formas circulares originales, siendo tales formas la forma de energía mínima, y se reduce significativamente el grosor de la pared de la preforma. Este procedimiento de estirado se ha adaptado para formar tubos de SiO₂ transparentes de pared gruesa para su uso en la producción de celdas de flujo de una sola pieza (monolíticas), por ejemplo, las usadas en los instrumentos de hematología automatizados Coulter® modelo LH750 tal como se describe en patente estadounidense n.º 5.125.737 legalmente cedida (a continuación en el presente documento, la patente '737) y fabricados y comercializados por Beckman Coulter, Inc. Después de estirarse una preforma hasta un diámetro interno preferido (por ejemplo, 50 micrómetros), se cortan los tubos hasta una longitud preferida (por ejemplo, aproximadamente 6 mm), y se lapa una parte plana adecuada (por ejemplo, de 1 mm de anchura) sobre la superficie cilíndrica exterior del tubo que, como resultado del estirado, se ha reducido hasta un diámetro de aproximadamente 3,5 mm. La parte plana proporciona un orificio óptico a través del cual puede acoplarse un haz de radiación (por ejemplo, a partir de un láser de HeNe), a lo largo de un diámetro, al canal cilíndrico central en el tubo estirado. Se hace que la parte plana sea sustancialmente paralela al eje de canal en una ubicación arbitraria en la superficie cilíndrica exterior, por ejemplo, para evitar un defecto óptico inaceptable en la pared. El canal cilíndrico se agranda parcialmente perforando desde ambos extremos hasta un diámetro adecuado (por ejemplo, 1,25 mm), dejando *in situ* una longitud corta (por ejemplo, 65 micrómetros) del canal original en el centro de la celda de flujo que desemboca en cada extremo en un pequeño rebaje en forma de copa (por ejemplo, con un radio de 600 micrómetros) sustancialmente tangente a un cono de 90 grados coaxial con el canal original y continuo con las perforaciones de extremo. En uso, la longitud del canal original en la sección longitudinal así formado funciona como conducto de volúmetro de Coulter, y las perforaciones cilíndricas se comunican con cámaras de electrodo externas en una estructura de soporte, mediante lo cual puede hacerse que el líquido de muestra en un líquido de protección de enfoque hidrodinámico pase de manera central a través del conducto de volúmetro. Se adquieren señales de V y C de Coulter a partir de los electrodos a medida que cuerpos formados pasan a través del conducto de volúmetro; mientras tanto, se adquieren de manera simultánea señales de dispersión frontal (FS) del haz de radiación a partir de los cuerpos formados individuales a medida que pasan a través del conducto de volúmetro cilíndrico.

Las celdas de flujo óptico del tipo anterior, es decir, celdas de flujo realmente monolíticas producidas a partir de una sola pieza sin uniones de material transparente, evitan de manera inherente muchas de las limitaciones y desventajas descritas anteriormente para celdas de flujo compuestas que comprenden componentes transparentes unidos de geometrías complementarias. Las señales de dispersión frontal (FS) adquiridas a partir de tales celdas de flujo permiten una diferenciación y enumeración fiables de cuerpos formados individuales cuando se correlacionan de manera adecuada con señales de V y C de Coulter. Sin embargo, dado que tanto la envolvente ópticamente transparente como el conducto de volúmetro interior central de tales celdas de flujo muestran una sección transversal sustancialmente circular, la pared de tales celdas de flujo actúa como lente no axisimétrica, y las señales de dispersión (S) adquiridas a través de la misma presentan aberraciones ópticas sustanciales que limitan la capacidad de diferenciar entre determinados tipos de cuerpos formados. Aunque tal diferenciación puede mejorarse añadiendo señales de fluorescencia (F) a diferentes longitudes de onda, por ejemplo, marcando selectivamente los cuerpos formados con colorantes fluorescentes o conjugados de colorante-perla, tales señales de F se ven afectadas de manera incluso más desventajosa por las aberraciones ópticas que las diversas señales de dispersión. Por consiguiente, se ha dirigido un esfuerzo extenso a celdas de flujo que tienen un canal prismático rodeado por paredes planas tales como en la geometría cuadrada/cuadrada dada a conocer en la patente '652 anterior o para el conducto de volúmetro triangular dado a conocer en la solicitud de patente estadounidense 2007/0085997 y sus precursores, mediante lo cual pueden reducirse tales aberraciones ópticas. Sin embargo, tal como se indica, tales celdas de flujo son tanto difíciles de producir usando métodos de producción convencionales como propensas a fallo a lo largo del tiempo. Por tanto, aunque otros han propuesto celdas de flujo dentro de las cuales pueden realizarse tales mediciones simultáneas ópticas, u ópticas y de Coulter, en cuerpos formados individuales que fluyen a través de un canal prismático, nadie ha o bien puesto en práctica una celda de flujo realmente monolítica (es decir, de una sola pieza sin uniones) adecuada para tales aplicaciones o bien proporcionado una divulgación que permita técnicamente su reproducción para hacerlo.

El documento US2005/134833 A1 se refiere a métodos y aparatos para medir el contenido en hemoglobina de glóbulos rojos individuales de una muestra de sangre completa.

El documento US 5 125 737 A se refiere a un aparato y a un método para lograr la clasificación selectiva, discriminante, diferencial de tipos de célula sanguíneas individuales por medio de tecnología de tipo Coulter sin el uso de materiales o técnicas de tinción citoquímica.

5 El documento US 2005/180885 A1 se refiere a una cubeta de celda de flujo de protección aplicable a un citómetro de flujo, a un método de fabricación de la cubeta de celda de flujo de protección, y a un citómetro de flujo que incluye la cubeta de celda de flujo de protección.

10 El documento US 4 786 165 A se refiere a citometría de flujo del tipo en el que se obtiene una imagen instantánea de células tales como hemocitos en un flujo de líquido y se analiza.

Sumario de la invención

15 A la vista de la discusión anterior, un objetivo de esta invención es proporcionar un método mejorado para producir celdas de flujo óptico en el que el canal de flujo interior es prismático, un método que proporcione un rendimiento significativamente mejorado de celdas de flujo útiles fabricadas que sean menos propensas a fallo a lo largo del tiempo, y un método que proporcione celdas de flujo que permitan una mejor diferenciación de diversos tipos de cuerpos formados.

20 Otro objetivo de esta invención es proporcionar una celda de flujo óptico realmente monolítica (sin uniones) en la que la sección transversal del canal de flujo interno tenga una sección transversal que sea poligonal.

25 Todavía otro objetivo de esta invención es proporcionar un método mejorado para diferenciar de manera citométrica diversos tipos de cuerpos formados usando una celda de flujo óptico que tenga al menos tres ventanas planas a través de las cuales pueden derivarse diversos parámetros ópticos de cuerpos formados que pasan a través del canal prismático de la celda de flujo.

30 Aún otro objetivo de esta invención es proporcionar un método mejorado para diferenciar de manera citométrica diversos tipos de cuerpos formados usando una celda de flujo óptico que tenga al menos tres ventanas planas a través de las cuales pueden derivarse diversos parámetros ópticos de cuerpos formados que pasan a través del canal prismático de la celda de flujo y en una porción del canal de la misma puede detectarse al menos uno de los parámetros de volumen (V) y conductividad (C) de Coulter.

35 Las invenciones descritas y reivindicadas en el presente documento se basan en el descubrimiento de que la técnica de estirado de tubos usada para proporcionar celdas de flujo de pared gruesa que tienen secciones transversales cilíndricas tanto en el canal interno como en la envoltente externa pueden adaptarse para su uso en la producción de celdas de flujo óptico monolíticas que tienen un canal de flujo con una sección transversal no circular, preferiblemente poligonal. Resultó altamente inesperado que la geometría de una sección transversal deseada no circular (por ejemplo, poligonal) de un canal relativamente grande formado de manera central en una preforma cilíndrica podía mantenerse durante una operación de calentamiento y estirado en la que el área de la sección transversal del canal de preforma se contrae en un factor de al menos 1.000:1 para producir un canal de flujo poligonal del tamaño requerido para el análisis citométrico de cuerpos formados tales como células sanguíneas.

40 Un método preferido según la reivindicación 1 para producir una celda de flujo óptico del tipo anterior comprende las etapas simultáneas de calentar y estirar una preforma de material transparente, lo más preferiblemente sílice amorfa sintética (es decir, dióxido de silicio, SiO₂). La preforma comprende un tubo cilíndrico de tal material que tiene un canal central, que se extiende axialmente, que presenta una sección transversal sustancialmente uniforme de una forma poligonal deseada, por ejemplo, triangular, rectangular o hexagonal. De manera menos deseable, la preforma es un vástago de dimensiones adecuadas formado mediante el procedimiento de planarización anteriormente descrito. La preforma tiene preferiblemente una parte plana formada en su superficie exterior cilíndrica, formándose tal parte plana de manera sustancialmente paralela a una de las superficies planas de la sección transversal poligonal interior del canal. La preforma se calienta hasta una temperatura predeterminada por encima de la temperatura de reblandecimiento de vidrio, y se estira a una tasa controlada, durante un tiempo controlado y a una orientación angular constante, mediante lo cual se mantiene la forma poligonal del canal interno durante la operación de estirado, se mantiene el paralelismo entre la parte plana externa y la superficie plana del canal de flujo poligonal, y se logran las dimensiones deseadas de canal de flujo después del enfriamiento. Después de enfriar la estructura tubular estirada y cortarse hasta una longitud deseada, se usa la parte plana en la superficie exterior como superficie de referencia, mediante lo cual puede lapearse una superficie plana óptica a un ángulo predeterminado con respecto a dicha parte plana y sustancialmente paralela a una de las superficies planas del canal de flujo poligonal interior.

45 Una envoltente que comprende una pluralidad de superficies planas se lapea sobre la superficie exterior de la estructura estirada, usando la primera superficie óptica como superficie de referencia contra la cual se mide el ángulo de las superficies adicionales, mediante lo cual puede hacerse la envoltente exterior de la estructura estirada de una sección transversal poligonal que tiene una forma similar al canal interior, es sustancialmente coaxial con el mismo y tiene lados sustancialmente paralelos al mismo. Alternativamente, puede esmerilarse y pulirse una envoltente que comprende una superficie de revolución no cilíndrica sobre la superficie exterior de la estructura estirada de tal manera que una porción residual de dicha parte plana puede lapearse sustancialmente paralela a una

de las superficies planas del canal de flujo poligonal interior, formando por tanto una ventana plana en la superficie de revolución. De manera menos deseable, puede omitirse la parte plana en la superficie exterior cilíndrica de la preforma y lapearse la superficie exterior de la estructura estirada para proporcionar una superficie de referencia plana, por ejemplo, que se extiende preferiblemente de manera sustancialmente paralela a una de las superficies planas del canal de flujo poligonal interior, usándose entonces dicha superficie de referencia para lapear superficies planas adicionales sobre la superficie exterior de la estructura estirada o para formar una ventana plana en una superficie de revolución de la manera anteriormente mencionada.

Según la reivindicación 9, se proporciona una celda de flujo óptico mejorada para su uso en un citómetro de flujo del tipo adaptado para caracterizar partículas pequeñas basándose al menos en sus propiedades ópticas respectivas. Una celda de flujo de este tipo comprende una estructura monolítica de material ópticamente transparente. Preferiblemente, la estructura monolítica se produce mediante un procedimiento de calentamiento/estirado. Una porción de tal estructura monolítica define un canal prismático a través del cual puede hacerse que pasen cuerpos formados mientras se irradian mediante radiación óptica que pasa a través de la estructura. Al menos una porción axial de tal canal de flujo tiene una sección transversal de forma poligonal, mediante lo cual entra radiación óptica en el canal de flujo para irradiar cuerpos formados dentro del canal de flujo, y radiación óptica resultante de dicha irradiación sale del canal de flujo formando ángulos diferentes a través de superficies planas o a través de una superficie de revolución no cilíndrica coaxial con dicho canal de flujo. Preferiblemente, la sección transversal poligonal del canal de flujo interno tiene de tres a ocho lados. En una realización preferida, la envolvente de la estructura monolítica también tiene forma prismática, siendo el número de lados de prisma igual al número de lados del canal de flujo y sustancialmente paralelos al mismo, mediante lo cual se proporciona una pluralidad de ventanas planas a través de las cuales puede entrar y salir radiación del canal de flujo. Alternativamente, para permitir que salga radiación de la celda de flujo con desviación mínima debida a refracción en el límite de envolvente, puede esmerilarse y pulirse una envolvente que comprende una superficie de revolución no cilíndrica sobre la superficie exterior de la estructura estirada, y si dicha envolvente está dotada de una parte plana apropiada sustancialmente paralela a una de las superficies planas del canal de flujo poligonal interior, puede acoplarse ventajosamente radiación al canal de flujo a través de una ventana plana.

Según la reivindicación 13, se proporciona un uso de la celda de flujo óptico de la invención en un método para diferenciar cuerpos formados en una muestra líquida, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar una celda de flujo monolítica del tipo descrito en el presente documento que tiene un canal de flujo interno de sección transversal poligonal y que tiene una envolvente que comprende al menos cinco paredes diferenciadas; (b) hacer pasar cuerpos formados a través del canal de flujo poligonal mientras se irradian tales cuerpos formados con un haz de radiación que pasa a través de una de tales paredes; (c) detectar señales de dispersión frontal (FS) a partir de los cuerpos formados irradiados a través de una segunda de tales paredes; (d) detectar señales de fluorescencia (F) a partir de los cuerpos formados irradiados a través de al menos una tercera de tales paredes; (e) detectar señales de dispersión lateral (SS) a partir de las partículas irradiadas a través de una cuarta pared; y (f) detectar señales de retrodispersión (BS) a partir de los cuerpos formados irradiados a través de una quinta de tales paredes. Alternativamente, tales señales ópticas pueden adquirirse de una manera correspondiente mediante una pluralidad de sensores independientes posicionados de manera apropiada alrededor de una celda de flujo monolítica de este tipo que comprende una superficie de revolución no cilíndrica en vez de paredes planas. Preferiblemente, al menos algunas de las mediciones ópticas anteriores se combinan con al menos una de mediciones de volumen V y de conductividad C de Coulter, realizadas de manera simultánea en los cuerpos formados irradiados que pasan a través del canal de flujo, para diferenciar tales cuerpos formados.

La invención y sus diversas ventajas se apreciarán mejor a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas, haciéndose referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una ilustración esquemática de las porciones de procesamiento de muestras y de adquisición de datos de un citómetro de flujo que incorpora una realización preferida de una celda de flujo óptico monolítica de cuatro lados estructurada y fabricada según el método de la invención;

la figura 2 es una ilustración en perspectiva de la celda de flujo óptico usada en el instrumento de la figura 1;

las figuras 3 y 4 ilustran secciones longitudinal y transversal de la celda de flujo óptico mostrada en la figura 2, incluyendo la figura 3 el eje de celda de flujo y tomándose la figura 4 en un plano a través de la zona de detección de partículas de la celda de flujo que es paralelo a las caras de extremo de celda de flujo;

la figura 5 es una ilustración en perspectiva de una celda de flujo óptico monolítica de seis caras que se produce fácilmente mediante el método de fabricación de la invención y es útil en otra realización de la instrumentación de la figura 1;

la figura 6 ilustra una celda de flujo óptico hexagonal y un modo de uso;

la figura 7 es una ilustración esquemática de las porciones de procesamiento de muestras y de adquisición de datos de un citómetro de flujo que se basa únicamente en propiedades ópticas de cuerpos formados para diferenciar subpoblaciones de los mismos, en las que se adquieren parámetros distintivos a partir de cuerpos formados que transitan por el canal de flujo hexagonal ilustrado en la figura 6;

5 las figuras 8A y 8B ilustran dos etapas de un procedimiento preferido para producir una preforma que es útil en el método de fabricación de la invención, es decir, del tipo usado en la producción de las celdas de flujo óptico monolíticas de la invención;

10 las figuras 9 a 12A-12C ilustran otras realizaciones de celdas de flujo óptico monolíticas producidas mediante el método de la invención; y

la figura 13 ilustra una vista en sección transversal a través de la zona de detección de partículas de celdas de flujo de la técnica anterior del tipo en las figuras 2 y 9, fabricándose la celda de flujo de la figura 2 a partir de esta última.

15 Descripción detallada de realizaciones preferidas

Los citómetros de flujo adquieren datos importantes para diagnóstico a partir de muestras de líquidos corporales de paciente que contienen diversos cuerpos formados y se han desarrollado muchas realizaciones diferentes. Todas dependen de un canal en una celda de flujo a través del cual pueden hacerse pasar tales muestras después de someterse a diversos protocolos preparatorios y en las que pueden detectarse diversas propiedades de los cuerpos formados, mediante lo cual pueden diferenciarse y enumerarse los diversos tipos de subpoblaciones de cuerpos formados en las mismas y procesarse y correlacionarse los parámetros derivados para proporcionar diagnósticos deseados. Tal como se comentó anteriormente, los citómetros de flujo que incorporan la adquisición simultánea de parámetros ópticos y de V y/o C de Coulter a partir de un cuerpo formado individual requieren dentro del canal de flujo de sus celdas de flujo óptico una constricción (o conducto de volúmetro) que tiene longitudes y secciones transversales relativamente pequeñas. Un analizador de hematología de este tipo se da a conocer más completamente en la patente estadounidense n.º 6.228.652 anteriormente indicada, en la que son coinventores dos de los presentes coinventores y cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia. En resumen, el analizador es del tipo que funciona para detectar, diferenciar y contar automáticamente diversos tipos de cuerpos formados (por ejemplo, células sanguíneas, plaquetas, etc.) contenidos en diferentes muestras de líquidos corporales de paciente y para notificar sus hallazgos.

Haciendo ahora referencia a los dibujos, en los que, para claridad, todos los pasos de muestra internos se muestran agrandados y desproporcionados con respecto a envolventes de celda de flujo externas, la figura 1 ilustra esquemáticamente las porciones de procesamiento de muestras y de adquisición de datos de un analizador CA de este tipo que se distingue de analizadores de la técnica anterior por que comprende una celda 30 de flujo óptico monolítica mejorada (mostrada mejor en la figura 2) estructurada y fabricada según la presente invención. Tal como se ilustra, la celda 30 de flujo óptico es el componente central del conjunto T de transductor optoelectrónico del analizador que funciona para interrogar de manera óptica y eléctrica cada cuerpo formado en una muestra de paciente que va a analizarse. Las muestras de paciente (por ejemplo, muestras de sangre completa WBS) se presentan al analizador en diferentes tubos de ensayo o viales 10 que se mueven dentro del instrumento mediante un elemento ST de transporte de muestras. Tras la presentación de tales viales a una sonda P de aspiración, se aspira un volumen de muestra predeterminado a partir de cada uno. Cada muestra aspirada se segmenta mediante una válvula 12 de extracción de muestras de sangre convencional para producir una pluralidad de alícuotas (por ejemplo, A1-A3) que después se dispensan a diferentes cámaras de mezclado (por ejemplo, MC1-MC3) dentro de un componente 14 de preparación de muestras del analizador. Mientras está en las cámaras de mezclado, cada alícuota se mezcla con uno o más reactivos (por ejemplo, R1-R7) adaptados para reaccionar de manera selectiva con y/o diluir determinados tipos de cuerpos formados en la muestra. El componente 14 de preparación de muestras puede producir, por ejemplo, una muestra sometida a lisis y teñida, SL, que comprende predominantemente glóbulos blancos y otras células (por ejemplo, glóbulos rojos nucleados) que se han teñido con un colorante fluorescente; una muestra diluida y teñida, SD, que contiene todos los tipos de células sanguíneas en una suspensión altamente diluida, estando algunas de tales células (por ejemplo, el subconjunto de reticulocitos) teñidas con un colorante fluorescente; y una muestra sometida a lisis y marcada, ST, que comprende predominantemente glóbulos blancos en una suspensión, incluyendo glóbulos blancos seleccionados (por ejemplo, células positivas para CD4 y CD8) que se han teñido o marcado de otro modo, por ejemplo, mediante un anticuerpo monoclonal, con un fluorocromo o partícula fluorescente. Después se seleccionan volúmenes dosificados con precisión de cada una de las muestras preparadas, tal como se proporcionan mediante un mecanismo 16 de dosificación, mediante una válvula DV de distribución convencional y se bombean (por ejemplo, mediante bombas MP1, MP2 o MP3 de dosificación) a través de un orificio P1 de entrada de muestra del conjunto T de transductor optoelectrónico del analizador en un componente 18 de transductor; y bombas MP4 y MP5 de dosificación, respectivamente, proporcionan líquido SF de protección al orificio P5 del conjunto T de transductor para centrar hidrodinámicamente flujos de muestra a través del conducto Z de volúmetro de la celda 30 de flujo y mantener un diferencial de presión predeterminado entre las cámaras dentro de elementos 34 y 35 de tapa de conjunto T de transductor. Tal como se comentará, determinadas propiedades ópticas, físicas y eléctricas de cuerpos formados individuales u otras partículas en las muestras se detectan de manera simultánea y se convierten en señales eléctricas a medida que se dosifican individualmente las muestras a

través del conducto Z de volúmetro. Tales señales se producen como pulsos eléctricos y son parámetros, por ejemplo, del volumen de CC (V) y la conductividad eléctrica de RF (C) de cada cuerpo formado según se determina mediante el principio de Coulter, su absorción de radiación (A), sus diversas propiedades de dispersión de luz (S) [es decir, dispersión frontal (FS), dispersión lateral (SS) y/o retrodispersión (BS)], y sus propiedades de fluorescencia (F) a diferentes longitudes de onda. Diversas combinaciones de tales señales se procesan mediante componentes de citómetro convencionales, tal como se da a conocer en la patente '652 pero no se muestra en la figura 1, para proporcionar información apropiada para la correlación mediante algoritmos que proporcionan información de diagnóstico deseada.

Las celdas de flujo óptico, por ejemplo, la celda 30 de flujo en la figura 1 fabricada según el método de la presente invención, constituyen el elemento esencial en el procedimiento de transducción que acaba de exponerse resumidamente. El método mejorado mediante el cual se fabrica la celda 30 de flujo se distingue de las celdas de flujo de la técnica anterior y puede aplicarse generalmente a una amplia variedad de realizaciones de celdas de flujo óptico. Fabricada a partir de un material transparente, monolítico y sin uniones (es decir, sin interrupciones), la celda 30 de flujo comprende generalmente un canal interno a través del cual pueden dosificarse muestras preparadas y que tiene una envolvente externa adecuada para la adquisición de parámetros ópticos a partir de cuerpos formados en tales muestras. Tal como se detallará a continuación, según la invención dicha estructura monolítica se fabrica en primer lugar como una preforma sobredimensionada de sílice (SiO_2 , habitualmente denominado "cuarzo") o lo más preferiblemente de sílice amorfa sintética, de modo que el canal interior está limitado por tres o más superficies planas. Después se calienta la preforma hasta una temperatura predeterminada a la que su viscosidad permite la deformación y se estira axialmente a una tasa constante y predeterminada, mediante lo cual se reducen las secciones transversales de la preforma y su canal interior. Se ha descubierto que si durante tal operación de estirado se hace que la sección transversal de canal mantenga una orientación angular constante con respecto a la preforma sobredimensionada, al enfriar la estructura estirada se conserva inesperadamente la geometría no circular original del canal en una sección transversal poligonal sustancialmente uniforme de una dimensión deseada, teniendo dicho canal forma sustancialmente rectilínea y prismática. En realizaciones preferidas, las superficies planas que limitan tales canales interiores reducidos tienen una anchura (por ejemplo, W' tal como se muestra en la figura 4) que mide entre aproximadamente 40 y 250 micrómetros; si pueden usarse parámetros ópticos solos para caracterizar y diferenciar los cuerpos formados de interés, la anchura de canal de flujo es normalmente de 100 micrómetros o más, pero si se desean uno o más parámetros de Coulter, la anchura de canal de flujo es normalmente de 150 micrómetros o menos. En etapas de fabricación posteriores, se dota un segmento apropiado de tal estructura estirada de una envolvente exterior apropiada para requisitos de una aplicación particular, es decir, que comprende una pluralidad de superficies ópticas planas paralelas a al menos algunas de dichas superficies de canal (por ejemplo, como en las figuras 2 a 6 y las figuras 9 a 11) o que forman una superficie de revolución no cilíndrica (por ejemplo, como en las figuras 12A a 12C). Los segmentos, fabricados para proporcionar acabado óptico y dimensiones de envolvente deseados, son muy adecuados para su uso como celdas de flujo en citómetros de flujo que se basan únicamente en métodos de transducción óptica. La naturaleza monolítica de celdas de flujo producidas de este modo supera las faltas de homogeneidad óptica, modos de fallo y desventajas de fabricación de estructuras de múltiples componentes de forma similar fabricadas mediante procedimientos de la técnica anterior mencionados anteriormente basándose en el ensamblaje de materiales sólidos truncados o placas planarizadas complementarias. Para limitar efectos de aberraciones en parámetros ópticos asociados con celdas de flujo monolíticas cilíndricas, secciones transversales coplanares de la envolvente de celda de flujo y de la porción de detección de partículas del canal interno pueden ser polígonos geoméricamente similares que tienen lados que son sustancialmente paralelos, por ejemplo, en las figuras 2 y 3 las secciones transversales de la envolvente definida por las superficies 50 rectangulares, planas, ópticamente pulidas, y de la porción Z del paso 32 son ambas sustancialmente cuadradas, proporcionando por tanto el material transparente, que forman la pared de la celda 30 de flujo, ventanas de grosor sustancialmente uniforme a través de las cuales pueden determinarse parámetros ópticos de cuerpos formados que transitan por dicha porción de detección. En la realización mostrada en la misma, la anchura W de los lados 50 es preferiblemente de entre 2 y 8 mm, la longitud L de los lados es normalmente de entre 5 y 25 mm, y la longitud de la porción Z del paso 32 es normalmente de entre 50 y 300 micrómetros. Para proporcionar una realización preferida que incluye una zona de detección de partículas adecuada para la transducción de parámetros de V y/o C de Coulter a partir de cuerpos formados en muestras de sangre completa, la anchura respectiva de cada lado de canal de la porción Z en el paso 32 es de aproximadamente 50 micrómetros, proporcionando por tanto un área de la sección transversal para dicha porción Z de aproximadamente $2500 \text{ micrómetros}^2$ dentro de una envolvente en la que la anchura respectiva W de cada lado 50 es de aproximadamente 4,2 mm y la longitud respectiva L de cada lado 50 es de aproximadamente 6,3 mm. Tal como se muestra en las figuras 2 y 3, el paso 32, que se extiende entre las superficies 36 de extremo opuestas de la celda 30 de flujo y normalmente coaxial con su eje longitudinal A, se agranda preferiblemente a partir de dicho canal interno prismático a través de las superficies 36 de extremo para formar una forma de reloj de arena que tiene perforaciones 54 cilíndricas y superficies 55 de revolución que proporcionan una transición suave desde las mismas hasta una porción del canal original. Las longitudes preferidas para la porción Z del canal original oscilan entre aproximadamente 1,2 y 1,4 veces la anchura del lado de canal, o entre aproximadamente 60 y 75 micrómetros para la presente realización preferida, pero longitudes superiores pueden ser ventajosas a altas velocidades de flujo de muestra. Por tanto, la porción Z del canal original define en las inmediaciones del punto central axial del paso 32 un conducto de volúmetro de sección transversal poligonal uniforme dentro del cual pueden determinarse de manera simultánea no sólo los parámetros de V y C de Coulter, sino también los diversos parámetros ópticos A, S y F, de

cuerpos formados que pasan individuales. Tal como se muestra en las figuras 1 a 4, un haz B de radiación óptica entra y sale del conducto Z de volúmetro a través de un par de ventanas formadas entre sus lados planos y los lados 50 planos de la celda 30 de flujo, y por tanto se evitan aberraciones ópticas asociadas con las superficies cilíndricas de las celdas de flujo monolíticas anteriormente mencionadas; en la realización preferida anteriormente mencionada el grosor de dichas ventanas es aproximadamente 41 veces la anchura de canal, requiriendo un grosor de pared 5 mínimo de aproximadamente 57 veces la anchura de canal en la estructura estirada usada en su fabricación. Las superficies 36 de extremo de la celda 30 de flujo en las figuras 2 y 3 están acopladas a los elementos 34 y 35 de tapa de la figura 1 que, mediante su geometría interna, definen cámaras a través de las cuales puede acoplarse tanto una muestra que va a analizarse como un líquido SF de protección, usado para enfocar hidrodinámicamente o 10 centrar la muestra a través de dicha zona Z de detección de partículas, al interior del paso 32 y, después de pasar a través del mismo, se purgan de manera apropiada al desecho, preparando así el paso 32 para el análisis de una muestra diferente.

Tal como se muestra en la figura 1, los elementos 34 y 35 de tapa están dotados de una pluralidad de orificios P1-P6 15 que sirven para 1) introducir una o más muestras preparadas que van a analizarse y un líquido de protección en la celda 30 de flujo, 2) drenar muestra(s) existente(s) y líquido de protección al desecho, 3) purgar una o ambas cámaras internas en las tapas 34 y 35 al desecho, y 4) proporcionar un vacío para preparar tubos que alimentan los diversos orificios. El orificio P1 está acoplado por conexión de fluido al componente 16 de dosificación y sirve para introducir alcuotas dosificadas de muestra SL, SD o ST según se selecciona mediante la válvula DV de distribución 20 a la boquilla 56 para su inyección al interior del paso 32 de la celda 30 de flujo para su análisis tal como se muestra en la figura 3. (Se entiende que en otras realizaciones pueden usarse otros métodos de inyección de muestra, por ejemplo, mediante la boquilla de múltiples orificios de la patente '652). El orificio P2 también está acoplado por conexión de fluido al componente 16 de dosificación y sirve para introducir volúmenes dosificados de un líquido S1 de protección a la cámara en el elemento 34 de tapa, sirviendo tal líquido para enfocar hidrodinámicamente o centrar 25 muestras en el conducto Z de volúmetro. En la figura 3, la boquilla 56 de introducción de muestra (que sólo se muestra parcialmente) tiene un canal C1 en el que el orificio P1 acopla un volumen dosificado con precisión de muestra suministrada por el componente 16 de dosificación de la figura 1; dicho canal sirve para proyectar una corriente de muestra hacia la zona Z de detección de partículas. Mientras tanto, un volumen dosificado de líquido S1 de protección que ha entrado en la cámara 34, a presión mediante MP4 y a través del orificio P2, fluye a través del 30 paso 32. Tal como se muestra en la figura 3, el líquido S1 de protección rodea de manera uniforme la corriente de muestra y hace que la muestra fluya a través del centro del conducto Z de volúmetro, logrando por tanto un enfoque hidrodinámico de la corriente de muestra. Tras salir del conducto Z de volúmetro, la muestra y el líquido de protección se recogen mediante el tubo 58 de salida de muestra de la figura 1 (mostrado sólo parcialmente en la figura 3), evitando por tanto que cuerpos formados en recirculación interfieran con las determinaciones de volumen de CC (V) y conductividad eléctrica de RF (C) de Coulter. En la figura 3, se muestra una primera célula BC1 35 sanguínea después de salir del canal en la boquilla 56, se muestra una segunda célula BC2 sanguínea en el centro del conducto Z de volúmetro y en el trayecto del haz B de láser enfocado y se muestra una tercera célula BC3 sanguínea entrando en el tubo 58 de salida de muestra, que está conectado al desecho a través del orificio P4 en la figura 1. Para controlar la presión de fluido en la cámara dentro de la tapa 35 y de ese modo controlar el flujo de muestra después de que salga del paso 32, dicha cámara se mantiene llena de líquido S2 de protección, entrando tal líquido a través del orificio P5 y drenando al desecho a través del orificio P4. Tras la adquisición de datos a partir de cada muestra, se prepara el conjunto T de transductor para una muestra posterior purgando las cámaras en las 40 tapas 34 y 35 con líquido de protección, respectivamente, S1 desde MP4 al interior del orificio P2 y fuera del orificio P3, y S2 desde MP5 al interior del orificio P5 y fuera del orificio P6.

Tal como se muestra en la figura 1, dentro de las cámaras interiores en los elementos 34 y 35 de tapa hay 45 electrodos 40 y 38 internos respectivos que pueden conectarse a un circuito 41 de CC/RF. Los componentes de tal circuito funcionan para (a) producir corrientes de CC y RF a través del paso 32 de la celda 30 de flujo, y (b) detectar modulaciones en las corrientes de CC y RF respectivas producidas mediante el paso de cuerpos formados a través de la zona Z de detección de partículas de manera simultánea con las corrientes de CC y RF, mediante lo cual se determina el volumen de CC V de un cuerpo formado, así como su conductividad de RF C. Tal como se describe 50 más completamente en la patente '652, el circuito 41 de CC/RF comprende una fuente de corriente CC, un oscilador de CA/detector que funciona a una frecuencia de RF, un circuito de acoplamiento y preamplificadores. El circuito de acoplamiento combina de manera lineal las corrientes producidas por la fuente de CC y el oscilador de CA/detector, y aplica la corriente combinada al contenido del paso 32 en el conjunto T de transductor, tal como se describió 55 anteriormente. Preferiblemente, el componente de CA tiene una frecuencia de aproximadamente 22,5 MHz. A medida que pasan cuerpos formados en orden a través del conducto Z de volúmetro, se altera la impedancia del paso 32, dando como resultado una modulación de la corriente CC en función del volumen físico V del cuerpo (es decir, el volumen de CC) y una modulación de la corriente de RF en función de la conductividad interna C de la celda. El circuito de acoplamiento separa las corrientes moduladas de modo que se transmite una señal pulsada de CC V a un preamplificador de CC, y se detecta la corriente de RF modulada mediante el oscilador/detector, dando como resultado una señal pulsada C que se transmite al preamplificador de RF. Preferiblemente, ambas señales pulsadas de V y C de Coulter se acoplan al componente de análisis del instrumento, pero para algunas aplicaciones puede ser suficiente tan sólo una de tales señales. Alternativamente, otras aplicaciones pueden beneficiarse 60 mediante la inclusión en el circuito 41 de RF/CC de una pluralidad de circuitos de CA tal como se describe en este caso, funcionando cada uno a una frecuencia diferente.

A medida que cada cuerpo formado transita por el conducto Z de volúmetro en las figuras 1 a 4, se irradia al pasar a través de un haz B de láser enfocado con una distribución de energía apropiada, según se proporciona por un láser 42 adecuado y óptica 62 de conformación de haz. El láser 42 puede ser de cualquier tipo apropiado, por ejemplo un láser de diodos, que proporciona radiación adecuada para la aplicación, por ejemplo, radiación en el intervalo de longitud de onda de 635 a 640 nm si los parámetros de dispersión (S) son de interés principal, o en el intervalo de longitud de onda de 485 a 490 nm si también se requieren determinados parámetros de fluorescencia (F). La radiación (luz) dispersada por cada cuerpo formado puede detectarse mediante uno o más fotodetectores de dispersión de luz (por ejemplo, LSD1-LSD3) y radiación fluorescente, si la hay, emitida por la tinción fluorescente del cuerpo formado o marcador fluorescente como resultado de excitarse por la radiación de láser, puede detectarse mediante uno o más detectores de fluorescencia (por ejemplo, FD1-FD3). En la sección longitudinal de la celda 30 de flujo mostrada en la figura 3, dicho haz B de láser se enfoca mediante dicha óptica de conformación de haz para proporcionar una distribución gaussiana bidireccional elíptica de radiación centrada en el conducto Z de volúmetro con el eje mayor de la distribución elíptica perpendicular al flujo de muestra, pero una óptica de conformación de haz convencional estructurada para proporcionar una línea enfocada de intensidad de radiación uniforme a través de dicho conducto es preferible en aplicaciones que requieren pequeños coeficientes de variación en parámetros ópticos adquiridos. En la vista en sección transversal de la celda 30 de flujo mostrada en la figura 4, tal haz entra en la pared delantera del conducto Z de volúmetro, se encuentra con la célula BC2 sanguínea en la zona de detección óptica, y hace que pase radiación de dispersión lateral SS y radiación fluorescente F a través de las paredes laterales opuestas del conducto Z de volúmetro, mientras que luz de dispersión frontal FS y luz axialmente absorbida A pasan a través de la pared trasera de la zona Z de detección de partículas a lo largo del eje óptico OA.

Tal como se indicó anteriormente y tal como se describe más completamente en la patente '652, radiación (luz) dispersada a partir del haz B de láser enfocado mediante cuerpos formados, que pasan en orden a través de tal haz dentro de la detección Z de partículas de la celda 30 de flujo tal como se muestra en las figuras 3 y 4, se detecta mediante fotodetectores de dispersión de luz, por ejemplo, LSD1 y LSD3 en la figura 1. El detector LSD1 está estructurado y ubicado para detectar luz dispersada en una dirección hacia delante dentro de un intervalo angular entre aproximadamente 9 grados y 41 grados del eje de dicho haz, denominado dispersión de luz de ángulo medio (MALS). Este detector tiene dos regiones fotoactivas diferenciadas, OS1 y OS2, para detectar luz sometida a dispersión frontal en los intervalos angulares de entre aproximadamente 21 y 41 grados, denominada dispersión de luz de ángulo medio superior (UMALS), y entre aproximadamente 9 y 20 grados, denominada dispersión de luz de ángulo medio inferior (LMALS). Por tanto, LSD1 proporciona tres señales de dispersión frontal (FS), es decir, MALS, UMALS y LMALS. El detector LSD3 está ubicado para detectar luz dispersada en una dirección sustancialmente normal (es decir, a aproximadamente 90 grados \pm aproximadamente 10 grados) con respecto al eje del haz B, a través de una de las dos caras laterales de la celda 30 de flujo. El detector LSD3 comprende preferiblemente una lente 85 que recoge y dirige luz sometida a dispersión lateral sobre un diodo OS5 de PIN o similar y proporciona una señal de dispersión lateral (SS). Sin embargo, con relación a la descripción en la patente '652, LSD1 también incluye una abertura central a través de la cual tanto el haz de láser que surge de la celda 30 de flujo como la dispersión de luz a menos de aproximadamente 8 grados pasan sin obstrucciones como haz B1. El fotodetector LSD2 está ubicado de manera apropiada detrás de LSD1 y tiene dos regiones fotoactivas diferenciadas, OS3 y OS4, que están estructuradas para detectar dispersión de luz a aproximadamente 5,1 grados, denominada dispersión de luz de ángulo bajo (LALS) y la atenuación casi axial en B1, denominada pérdida de luz axial (ALL). Por tanto, el detector LSD2 proporciona dos señales adicionales para su análisis, es decir, una cuarta señal de FS, denominada LALS, y la señal de absorción (A), denominada ALL. Se entiende que cualquiera de los sensores anteriormente mencionados puede estar estructurado para responder a radiación dentro de otros intervalos angulares. También se entiende que, si se desea, un cuarto fotodetector, estructurado de manera similar a LSD1 y ubicado de manera adecuada entre la óptica 62 de conformación de haz y la celda 30 de flujo, proporcionará señales de retrodispersión (BS) a partir de cuerpos formados en la zona Z de detección de partículas. En la figura 1 se muestra el acoplamiento en el espacio libre entre el láser 42 y la óptica 62 de conformación de haz, entre la óptica 62 de conformación de haz y la celda 30 de flujo, y entre la celda 30 de flujo y los diversos fotodetectores, pero se entiende que en algunas realizaciones un acoplamiento de fibra óptica puede sustituir ventajosamente a tal acoplamiento en el espacio libre cualquiera de tales elementos funcionales en el componente 18 de transductor.

Resulta radiación fluorescente cuando luz a una longitud de onda de irradiación apropiada estimula emisión de luz a partir de restos fluorescentes a una o más longitudes de onda diferentes; tal como se indicó anteriormente, tales restos pueden estar unidos a, o insertados en, diversos cuerpos formados tal como se conoce en protocolos de preparación de muestras para su uso con citómetros de flujo de fluorescencia convencionales. Tal como se describe más completamente en la patente '652, se recoge radiación fluorescente a partir de tales cuerpos formados que pasan a través del haz B de radiación anteriormente mencionado en la zona Z de detección de partículas de la celda 30 de flujo mediante una lente 51 plano-convexa. La lente 51 está preferiblemente acoplada (por ejemplo, mediante cemento óptico o un gel con un índice de refracción apropiado y que tiene fluorescencia mínima) a la cara lateral de la celda 30 de flujo opuesta a aquella a través de la cual se detecta luz sometida a dispersión lateral mediante LSD3, funcionando tal lente para acoplar ópticamente radiación fluorescente que sale de la zona de detección de celdas a un segundo conjunto 70 de lente que la retransmite, a través de una red de espejos BS1 y BS2 dicróicos de división de haz y filtros 71, 72 y 73 de paso de banda, a una pluralidad de detectores FD1, FD2 y FD3 de fluorescencia, que pueden ser tubos fotomultiplicadores o similares. Si el haz B de radiación se origina a partir de un láser 42 que

funciona, por ejemplo, a 488 nm, dicha red puede diseñarse convencionalmente, por ejemplo, para acoplar, de la manera más eficiente, luz a 525 nm, 757 nm y 695 nm a los detectores FD1-FD3 de fluorescencia. De una manera convencional, cada detector de fluorescencia detecta radiación fluorescente en tal intervalo de longitud de onda predeterminado según las propiedades ópticas de los espejos dicroicos y filtros que lo preceden y convierte dicha radiación en señales eléctricas correspondientes. Se entiende que la red de espejos dicroicos de división de haz y filtros de paso de banda puede extenderse, para permitir detectores de fluorescencia adicionales para proporcionar señales a longitudes de onda adicionales a partir de cuerpos formados en la zona Z de detección de partículas, o que en algunas realizaciones un acoplamiento de fibra óptica puede sustituir ventajosamente al acoplamiento en el espacio libre entre cualquiera de los elementos ópticos en el componente 18 de transductor.

La figura 5 ilustra otra celda 30' de flujo óptico monolítica adaptada para su uso en otras realizaciones de la instrumentación de la figura 1. Al igual que la celda 30 de flujo de la figura 1, la celda 30' de flujo de la figura 5 se produce a partir de una sola pieza de un material transparente sin interrupciones, lo más preferiblemente sílice amorfa sintética (SiO₂). Una zona Z' de detección de partículas central, de sección transversal limitada por seis superficies 64 planas, se extiende aproximadamente 70 micrómetros a lo largo del eje longitudinal A' de la celda 30' de flujo. La envolvente de la celda 30' de flujo también tiene forma prismática, que está limitada por seis lados 60 laterales de forma rectangular, y un par de superficies 61 de extremo planas opuestas de forma hexagonal. Preferiblemente, las secciones transversales hexagonales respectivas de la zona Z' de detección de partículas y la envolvente de la celda 30' de flujo son sustancialmente similares y coaxiales, estando las seis superficies 60 planas que definen el límite lateral de dicha envolvente dispuestas sustancialmente paralelas a las seis superficies 64 planas respectivas de la zona Z' de detección de partículas. Al estar dichas secciones transversales dispuestas de ese modo, se proporcionan seis paredes de grosor uniforme predeterminado y que forman ventanas planas para introducir un haz de radiación en la zona Z' de detección de partículas y para acoplar tal radiación fuera de dicha zona de detección de partículas después de la interacción con cuerpos formados que pasan en orden a través de la misma. Las superficies 61 de extremo planas opuestas están acopladas de manera similar en el circuito fluido de soporte tal como se describió para las superficies 36 de extremo de la celda 30 de flujo de la figura 1. En la figura 6 se presenta una sección transversal a través de la porción de detección de partículas del paso de muestra en una celda 30" de flujo óptico de seis lados; por tanto, la figura 6 también es representativa de una celda puramente de flujo óptico que tiene un canal de flujo prismático uniforme o uno que permite la adquisición de parámetros tanto ópticos como de Coulter dentro de una porción de tal canal que forma un conducto de volúmetro. En este caso, un haz B de láser pasa a través de la ventana W1 para irradiar un cuerpo FB formado que pasa a través de la zona Z" de detección de partículas en una dirección perpendicular al plano del dibujo. Se determina la absorbancia (A) del haz B mediante el cuerpo FB formado irradiado a partir de la intensidad del haz B' parcialmente absorbido que pasa a través de la ventana W2, por ejemplo, mediante la porción OS4 del fotodetector LSD2 de la figura 1. La luz sometida a dispersión frontal mediante el cuerpo formado irradiado se mide a dos ángulos diferentes (LS1 y LS2) a través de las ventanas W2 y W4, por ejemplo, LS1 a través de la ventana W2 mediante una o más regiones OS1, OS2 y OS3 fotoactivas de los fotodetectores LSD1 y LSD2 de la figura 1; y LS2 a través de la ventana W4 mediante la región OS1 fotoactiva ubicada de manera adecuada del fotodetector LSD3 de la figura 1. La radiación de fluorescencia emitida a diferentes longitudes de onda puede medirse a través de una o más de las ventanas W3, W5 y W6 restantes mediante repeticiones completas o parciales de la red de recogida y separación de longitud de onda de la figura 1 para fluorescencia descrita en relación con la realización de la figura 1. Sin embargo, en muchas aplicaciones que requieren mediciones de fluorescencia no se necesita tal elaboración y, mediante los lados adicionales a la zona de detección interna y envolvente de celdas de flujo tal como se muestran en las figuras 5 y 6, pueden medirse múltiples parámetros de fluorescencia por separado a través de una ventana dedicada, evitando por tanto las complicaciones prácticas debidas a los divisores BS1 y BS2 de haz en serie en el trayecto de detección de fluorescencia mostrado en la figura 1. En tales realizaciones, F1 y F2 se miden a través de las ventanas W3 y W5 respectivamente, por ejemplo mediante repeticiones ubicadas de manera adecuada de la lente 51, el conjunto 70 de lente, el filtro 73 y el detector FD3 de fluorescencia de la figura 1, pero sin BS1 y BS2 en el trayecto óptico. Se muestra luz a ángulos de retrodispersión bajos que sale de la ventana W6 pero, si es preferible, puede medirse radiación de fluorescencia a una tercera longitud de onda a través de esta ventana mediante una repetición de la lente 51, el conjunto 70 de lente, el filtro 73 y el detector FD3 de fluorescencia de la figura 1. Una realización de este tipo, que para claridad de ilustración se basa únicamente en parámetros ópticos, se ilustra en la figura 7, en la que las etiquetas repetidas a partir de la figura 1 tienen significados y funciones idénticos tal como se indicó en la discusión relacionada con la misma. En tales aplicaciones, la ausencia de un conducto de volúmetro hace que la purga de muestra tras el análisis adecuado sea más fácil de lograr, de modo que además de los electrodos 38 y 40 de detección de Coulter y el circuito 41 de RF/CC de la figura 1, no aparecen la segunda protección S2, su bomba MP5 y los orificios P3, P5 y P6 asociados en los elementos 34 y 35 de tapa del conjunto T de transductor en la figura 7. En esta última figura, el haz de B excitación de láser a partir del láser 42 y la óptica 62 de conformación de haz, o su equivalente de conformación de haz acoplado por fibra, entra en una ventana de la celda 30" de flujo óptico monolítica hexagonal y sale de una segunda ventana opuesta a la primera, después de someterse a dispersión mediante cuerpos formados en el canal Z" de flujo prismático. Tal luz sometida a dispersión frontal se intercepta por los fotodetectores LSD1 y LSD2 tal como se describió para la realización de la figura 1, produciendo así señales de dispersión frontal (FS) análogas. La radiación de fluorescencia emitida por restos fluorescentes sobre o dentro de los cuerpos formados (F1 y F2 en la figura 6) se intercepta por al menos uno de los módulos 75 y 76 de recogida de fibra óptica ubicados de manera adecuada a través de una tercera ventana (W3 o W5 en la figura 6) y se acopla a detectores FD5-FD14 de fluorescencia en la figura 7 mediante fibra 80 óptica; alternativamente, tal intercepción de

fluorescencia y conversión en señales eléctricas puede lograrse con acoplamiento en el espacio libre tal como se ilustra en la figura 1, ubicado de manera apropiada para recoger de manera eficiente fluorescencia emitida. La luz sometida a dispersión lateral de ángulo bajo (LS2 a través de una cuarta ventana W4 en la figura 6) puede interceptarse mediante la lente 85 de recogida y el fotodetector LSD3 de la figura 7 ubicados de manera adecuada para su conversión mediante la región OS5 fotoactiva de este último en una señal de dispersión lateral (SS). De manera similar, la luz sometida a retrodispersión de ángulo bajo (LS3 a través de una quinta ventana W6 en la figura 6) puede interceptarse mediante una combinación ubicada de manera adecuada de una lente de recogida (no mostrada, para minimizar confusiones) y el fotodetector LSD4 de la figura 7 para su conversión mediante la región OS6 fotoactiva de este último en una señal de dispersión lateral (SS); si es preferible, en vez de eso puede medirse radiación de fluorescencia a una tercera longitud de onda a través de esta ventana mediante una tercera disposición de recogida y transducción de fluorescencia ubicada de manera adecuada tal como se describió anteriormente. Se entiende que puede medirse luz directamente sometida a retrodispersión a través de la ventana W1 de la figura 6 en la misma manera que se describió anteriormente para la realización en la figura 1. Para aplicaciones que requieren transducción de parámetros de Coulter, la celda 30" de flujo debe comprender un paso adecuado que incluye perforaciones 54 apropiadas y superficies 55 de revolución tal como se muestra para la celda 30" de flujo en la figura 5; además, el conjunto T' de transductor requerirá los electrodos 38 y 40 de la figura 1 conectados al circuito 41 de CC/RF, la protección S2 y la bomba MP5, y los orificios P3, P5 y P6; todos de dichos componentes funcionan tal como se describió para la realización a modo de ejemplo ilustrada en la figura 1. Se entiende que realizaciones según la figura 7, pero adecuadas para aplicaciones particulares, pueden beneficiarse de tener o bien más o bien menos de seis ventanas ilustradas en la misma, es decir, celdas de flujo óptico monolíticas que tienen secciones transversales poligonales similares a través de la porción de detección de partículas de sus pasos de muestra y sus envolventes alineadas tal como se describe pero que tienen, por ejemplo, tres, cinco, siete u ocho ventanas. Aunque un ensamblaje convencional de pacas planarizadas o pirámides truncadas para proporcionar celdas de flujo óptico tal como se describe en el presente párrafo será prácticamente imposible, pueden proporcionarse celdas de flujo realmente monolíticas tanto para transductores puramente ópticos como para transductores combinados ópticos y de Coulter mediante la técnica de estirado de vidrio descrita a continuación.

Para fabricar una celda de flujo óptico monolítica sin interrupciones del tipo descrito anteriormente con referencia a las figuras 2-6, se prefiere usar una versión modificada de la técnica de estirado de vidrio actualmente usada para producir celdas de flujo cilíndricas de pared gruesa que tienen un canal de flujo de sección transversal circular tal como se usan en los analizadores de hematología Coulter® modelo LH750 producidos y comercializados por Beckman Coulter, Inc. Tal como se indicó en la porción introductoria de esta solicitud, en la técnica de elaboración del vidrio se conoce estirar tubos cilíndricos a partir de una preforma más grande de diversos diámetros internos y externos entre los cuales hay una pared cilíndrica de hasta varios centímetros de grosor. El grosor de pared requerido se logra deslizando, calentando y contrayendo sobre un primer tubo producido de una forma de sílice (SiO₂) un segundo tubo de este tipo más grande (un tubo de funda) y fusionando el segundo tubo al primer tubo, aumentando de ese modo sin interrupciones el grosor de pared de la preforma; tal etapa de colocación de funda se repite con fundas adicionales de diámetros internos y externos crecientes apropiados hasta que la estructura fusionada así formada tiene el grosor de pared requerido para proporcionar el grosor de pared de celda de flujo deseado después de estirarse la preforma para proporcionar el área de la sección transversal deseada en la estructura monolítica estirada y enfriada. Durante el procedimiento de estirado, se calienta la preforma hasta una temperatura predeterminada a la que su viscosidad permite la deformación, tras lo cual se estira axialmente, de manera habitual en una dirección verticalmente hacia abajo en una torre de estirado convencional, a una tasa constante y predeterminada. Durante este procedimiento, los diámetros de las secciones transversales interior y exterior de la preforma se reducen sustancialmente manteniéndose sustancialmente las formas circulares originales y reduciéndose significativamente el grosor de la pared de la preforma. Se entiende que el procedimiento de estirado también actúa para mejorar adicionalmente la integridad mecánica de superficies de contacto de fusión formadas durante el procedimiento de colocación de funda anteriormente mencionado, mediante lo cual las propiedades mecánicas de la estructura monolítica resultante se parecen estrechamente a las del material a granel a partir del cual se producen los diversos tubos usados en tal procedimiento. La retención de secciones transversales circulares es una cuestión relativamente sencilla dado que las secciones transversales están en la forma de energía mínima inherente en tales procedimientos de estirado de preforma. Mantener una sección transversal no circular durante tal procedimiento de estirado, particularmente del canal de flujo poligonal interno crítico tal como se requiere para producir las celdas de flujo óptico anteriormente descritas, no es sencillo en absoluto.

El método de fabricación de la invención comienza con la producción de una preforma adecuada, una que proporciona, después de la operación de estirado, la geometría deseada para la zona de detección de partículas y un grosor de pared suficiente como para permitir la fabricación de la envolvente de celda de flujo deseada. Tal preforma comprende un tubo de material silíceo transparente (por ejemplo, sílice, o más preferiblemente sílice amorfa sintética, SiO₂) que tiene un canal que se extiende axialmente que presenta una sección transversal sustancialmente uniforme de una forma poligonal deseada, por ejemplo, triangular, rectangular o hexagonal. Dicha forma en sección transversal del canal se logra insertando un mandril de sección transversal apropiada en un tubo del material silíceo y calentando el tubo para hacer que se contraiga sobre el mandril, haciendo de ese modo que el tubo adopte la forma de a lo largo de todo el canal interno rectilíneo así formado. Tal como se indicó anteriormente, la pared de la preforma debe ser tal como para proporcionar una envolvente de celda de flujo que tiene un grosor de pared (o ventana) deseado después de haberse estirado suficientemente la preforma para lograr el área de la

sección transversal deseada del canal interior. Para facilitar la fabricación de envoltentes que comprenden superficies planas, antes de estirar la preforma se somete a acabado preparando preferiblemente al menos una parte plana de referencia sobre su superficie exterior que es sustancialmente paralela a uno de los lados planos que definen su canal interior. Después del estirado, tal parte plana de referencia se usa para alinear la estructura estirada para operaciones de mecanizado convencionales posteriores requeridas para proporcionar y acabar la envoltente de celda de flujo y, si tienen que adquirirse parámetros de V y/o C de Coulter de manera simultánea en la zona de detección de partículas de la celda de flujo, la sección longitudinal requerida para una caracterización adecuada de cuerpos formados mediante el principio de Coulter.

Haciendo referencia a las figuras 8A y 8B, la producción de una preforma útil requiere un mandril M de una aleación de metal adecuada, por ejemplo, acero, mecanizado para tener una sección transversal similar a la de una zona de detección de partículas deseada, por ejemplo, Z o Z' en las figuras 1-4 y la figura 5 respectivas. Tal como se indica en las figuras 8A y 8B, para algunas geometrías deseadas un radio R' pequeño en las esquinas del mandril M puede ser beneficioso. Después se limpia de manera apropiada un tubo T1 cilíndrico del vidrio sílice deseado, lo más preferiblemente sílice amorfa sintética, y, tal como se muestra en la figura 8A, se desliza sobre dicho mandril, montándose entonces el tubo con el mandril dentro del mismo en un torno y haciéndose rotar. Tal como se conoce en la técnica de elaboración del vidrio, se aplica calor al tubo hasta que el vidrio alcanza su temperatura de reblandecimiento y su viscosidad está en el intervalo de 1×10^6 poise a 60×10^6 poise, más preferiblemente entre 3×10^6 poise y 28×10^6 poise, mediante lo cual el tubo reblandecido puede contraerse sobre el mandril y se hace que la sección transversal interior del tubo adopte la forma del mandril, tal como se muestra en la figura 8B. Preferiblemente, después de un enfriamiento apropiado, se retira el mandril del tubo contraído, pero de manera menos preferible puede dejarse en dicho tubo durante parte o la totalidad de un procedimiento de colocación de funda posterior. La sección transversal externa de la preforma debe ser suficiente para que, después de estirarse el tubo para proporcionar el área de la sección transversal de canal deseada, pueda fabricarse la envoltente de celda de flujo deseada, por ejemplo, en la figura 6, C" es el límite del área de la sección transversal máxima dejando una esquina no afilada beneficiosa en la celda 30" de flujo después de pulir las partes planas, que forman las superficies exteriores de las ventanas W1-W6, sobre un segmento de la preforma estirada. Para lograr el grosor necesario de las paredes de preforma, se desliza un segundo tubo de vidrio de tamaño apropiado (un tubo de funda), preferiblemente del mismo material vidrioso que el primero, sobre el primer tubo, y se hace rotar dicha combinación sobre un torno y se calienta para alcanzar una viscosidad dentro del intervalo anteriormente mencionado. A tal viscosidad, el segundo tubo se contrae sobre el primer tubo y los materiales síliceos se fusionan entre sí para formar un tubo monolítico que tiene una pared más gruesa. Este procedimiento se repite según sea necesario para lograr la sección transversal externa requerida para la celda de flujo deseada, sobre la que se enfría la estructura fusionada. Para las celdas 30 y 30' de flujo en las figuras 2 y 5 respectivas, una razón de preforma en sección transversal preferida (área de mandril/área de envoltente) es de entre $0,4 \times 10^{-4}$ y $5,1 \times 10^{-4}$, y lo más preferiblemente de aproximadamente $1,5 \times 10^{-4}$. Para las celdas de flujo a modo de ejemplo anteriormente mencionadas, los tubos usados en la producción de la preforma tienen un diámetro interno (DI) en el intervalo de entre 2 y 40 mm, o preferiblemente entre 6 y 20 mm, y un diámetro externo (DE) en el intervalo de entre 6 y 55 mm, o preferiblemente entre 15 y 35 mm. La preforma se construye preferiblemente a partir de tubos de sílice que se producen preferiblemente a partir de sílice sintetizada mediante un procedimiento de deposición química en fase de vapor o un procedimiento de sol-gel. El nivel de impurezas químicas de la sílice es preferiblemente de menos de 2600 ppm. Entre otras propiedades ventajosas tal sílice tiene una transmisión excepcional en el intervalo de longitud de onda de 250 a 400 nm y una fluorescencia intrínseca muy baja. El vidrio de sílice también puede contener dopantes, por ejemplo, Ge, P, F, B, Yb o Ti. Las concentraciones de dopantes totales pueden variar hasta el 10% en peso. Estos dopantes son útiles para ajustar las propiedades ópticas de la sílice, por ejemplo el índice de refracción, absorbancia o fluorescencia, y las propiedades físicas tales como punto de reblandecimiento, resistencia y distribución de esfuerzos. En comparación con otros vidrios de silicato, el vidrio de sílice fabricado de manera sintética también tiene una resistencia química muy buena, bajo coeficiente de expansión térmica y una concentración de defectos muy baja. La estructura de sílice estirada resultante del procedimiento de fabricación anteriormente descrito tiene una resistencia mecánica superior en comparación con tales estructuras fabricadas a partir de otros tipos de vidrio.

Se entenderá que las razones y dimensiones preferibles anteriormente indicadas se aplican a un procedimiento preferido para producir la celda 30 de flujo óptico monolítica de la figura 2 o 30' en la figura 5 que tiene, respectivamente, zonas Z o Z' de detección de partículas cuadradas o hexagonales de aproximadamente 50 micrómetros de parte plana a parte plana, con un grosor de pared para permitir un acabado apropiado después del estirado. Se dotan ambas celdas de flujo monolíticas de una envoltente que comprende superficies planas ópticamente pulidas que tienen separaciones de partes planas opuestas de 4,2 mm, con anchuras respectivas de 4,2 mm y 2,4 mm y longitudes de 6,3 mm. Se ha demostrado que ambas celdas de flujo funcionan en conjuntos de celda de flujo apropiados a los que se adaptó el aparato de la figura 1. Aunque los lados respectivos de las zonas de detección de partículas y envoltentes de tale celda de flujo pueden tener la misma anchura que en el caso de las celdas de flujo a modo de ejemplo, es decir, dichas secciones transversales son regulares, los lados pueden tener una anchura adaptada para lograr una relación de longitud de trayecto óptico o angular deseada entre el eje de flujo dentro de la zona de detección de partícula y los lados de envoltente, mediante lo cual puede proporcionarse un acoplamiento eficiente a sensores ópticos apropiados. Los expertos en las técnicas de elaboración del vidrio pueden adaptar estas enseñanzas a proporcionar zonas de detección y grosores de pared apropiados para otras aplicaciones pretendidas. Áreas de la sección transversal más grandes en tales celdas de flujo óptico monolíticas

requieren razones diferente y/o DE de preforma más grandes, y paredes más gruesas requieren DE de preforma más grandes. Adaptando de manera apropiada las razones y dimensiones, es posible formar elementos ópticos que tienen canales de más de 62.500 micrómetros² de área de la sección transversal que proporcionan datos ópticos aceptables (S y F) en un citómetro de flujo o grosores de pared de hasta 4,5 mm que proporcionan datos de V, C y S utilizables en analizadores de hematología convencionales.

Antes del estirado, se prefiere que la superficie exterior de la preforma anteriormente mencionada tenga al menos una única parte plana de referencia (por ejemplo, para proporcionar una parte plana de aproximadamente 1,85 mm de anchura después del estirado) formada sobre la misma mediante un procedimiento de esmerilado convencional, siendo tal parte plana aceptablemente paralela (por ejemplo, dentro de aproximadamente 1 grado) a una de las partes planas internas; si se desea, tales partes planas adicionales pueden esmerilarse paralelas a cada una de las superficies planas que forman el canal poligonal interno. Después se posiciona la preforma aplanada en una torre de estirado vertical en la que se calienta, mediante medios convencionales, hasta una temperatura de reblandecimiento predeterminada a la que su viscosidad permite la deformación, y se estira verticalmente hacia abajo a una tasa controlada, preferiblemente de entre 0,05 y 2 metros/minuto, durante un tiempo controlado y a una orientación angular constante, mediante lo cual se mantiene la forma en sección transversal poligonal del canal interno durante la operación de estirado y se logra el área de la sección transversal deseada de tamaño reducido en el canal enfriado. Después de enfriar la estructura tubular estirada y cortarla hasta una longitud deseada, se lapea la superficie exterior de tal estructura para proporcionar superficies de referencia planas adicionales, por ejemplo, que se extienden preferiblemente de manera sustancialmente paralela a cada una de las partes planas del canal de flujo interno, mediante lo cual la superficie exterior de la estructura estirada tendrá una sección transversal poligonal que tiene una forma similar al canal interior y es sustancialmente coaxial con el mismo. Obsérvese, tal como se muestra en la figura 6, que no es necesario que toda la superficie "C" cilíndrica original del elemento óptico se retire en las operaciones de aplanamiento, es decir, pueden no proporcionarse partes planas exteriores correspondientes a algunas partes planas de canal de flujo interior o el grosor de pared requerido para algunas ventanas puede dejar restos contiguos de la superficie de preforma original. Alternativamente, la preforma puede diseñarse y dimensionarse de modo que pueden alcanzarse las porciones ópticas deseadas de la envolvente al tiempo que se dejan ventajosamente tales restos: particularmente para envolventes de celda de flujo triangulares y cuadradas, superficies realmente planas que se extienden hasta una intersección forman una esquina suficientemente afilada como para experimentar astillamiento en el borde durante una manipulación normal, y por tanto normalmente se biselan tal como se muestra para las esquinas de la celda 30 de flujo en la figura 10 fabricada según la presente invención y la celda 30 de flujo en la figura 13 fabricada según el procedimiento de planarización de la técnica anterior. La necesidad de tal etapa de biselado puede eliminarse si se diseña la preforma para dejar un pequeño resto de la superficie original en las esquinas de la celda de flujo acabada, tal como se muestra para la celda 30" de flujo en la figura 6.

Un método preferido para diferenciar cuerpos formados usando la celda de flujo de la invención comprende las etapas de (a) proporcionar una celda de flujo del tipo descrito en el presente documento que comprende un material transparente monolítico sin uniones (es decir, sin interrupciones) que incluye un canal de flujo interno de sección transversal poligonal y que tiene al menos tres paredes diferenciadas (ventanas) a través de las cuales pueden detectarse parámetros ópticos; (b) hacer pasar cuerpos formados a través del canal de flujo poligonal mientras se irradian tales cuerpos formados con un haz de radiación que pasa a través de una de tales paredes; y (c) detectar diferentes parámetros ópticos de los cuerpos formados irradiados a través de las otras dos paredes. Más preferiblemente, tal celda de flujo tiene al menos cinco paredes diferenciadas (ventanas) a través de las cuales pueden detectarse parámetros ópticos y, tras irradiar cuerpos formados dentro del canal de flujo con un haz de radiación que pasa a través de una primera pared, detectar radiación de dispersión frontal a partir de los cuerpos formados irradiados a través de una segunda pared; detectar radiación de retrodispersión a partir de los cuerpos formados irradiados a través de una tercera pared; detectar características de fluorescencia de los cuerpos formados irradiados a través de una cuarta pared; y detectar radiación de dispersión lateral a partir de los cuerpos formados irradiados a través de una quinta pared. Preferiblemente, al menos algunas de las mediciones ópticas anteriormente mencionadas se combinan con mediciones de volumen de V y conductividad C de Coulter realizadas de manera simultánea en los cuerpos formados irradiados que pasan en orden a través del canal de flujo para diferenciar tales cuerpos formados.

A partir de la descripción anterior, se apreciará que se ha proporcionado una celda de flujo óptico nueva y mejorada. Al estar compuesta por una estructura monolítica, se eliminan todos los inconvenientes anteriormente indicados de dispositivos de múltiples componentes. Debido a la eliminación de uniones inherentes a celdas de flujo compuestas producidas ensamblando componentes complementarios, por ejemplo, CC1-CC4 en la celda 30 de flujo de la técnica anterior en la figura 13, se mejoran drásticamente los rendimientos durante procedimientos de mecanizado tras el estirado necesarios para formar una envolvente de celda de flujo deseada y conductos de volúmetro adecuados para la adquisición de parámetros de V y/o C de Coulter, tales como Z en la figura 2 o Z' en la figura 5. Además, se reducen las tasas de fallo durante el uso, y los cuerpos formados se diferencian más fácilmente. Además, el método de fabricación usado para proporcionar las celdas de flujo a modo de ejemplo puede aplicarse generalmente a la fabricación de una amplia variedad de realizaciones de celdas de flujo óptico.

La figura 9 es una ilustración en perspectiva de una celda 30 de flujo óptico de cuatro lados monolítica que se fabrica

mediante el método de la invención y es útil en una realización de la instrumentación de la figura 1 que se basa únicamente en propiedades ópticas de cuerpos formados para diferenciar subpoblaciones, en la que se adquieren parámetros distintivos a partir de cuerpos formados que transitan por el canal de flujo cuadrado ilustrado en la figura 4 y que pasan en orden a través del haz B de láser. Tales celdas de flujo monolíticas se han producido mediante el método anteriormente descrito que tienen canales 31 de flujo cuadrados de 47, 52, 65, 75, 100, 140 ó 250 micrómetros entre sus superficies de canal planas y envolventes cuadradas de 2,4, 3,5 ó 4,2 mm de anchura W entre las superficies 50 exteriores planas lapeadas paralelas a las superficies de canal interno; se han proporcionado longitudes L de envolvente de 6,3, 9,2 ó 12,5 mm entre las superficies 36 de extremo. Una celda de flujo de este tipo, que tiene dimensiones de canal de 52 por 52 micrómetros y anchuras de envolvente de 4,2 mm y longitud de 6,3 mm, se procesa adicionalmente para dar la celda 30 de flujo a modo de ejemplo en la figura 2 y se usa en el analizador de hematología Unicel® DxH recién introducido producido y comercializado por Beckman Coulter, Inc. Otra celda de flujo de este tipo, que tiene dimensiones de canal de 250 por 250 micrómetros y anchuras de envolvente de 4,25 mm y longitud de 12,7 mm, se ha demostrado experimentalmente en el citómetro de flujo de fluorescencia XL™, también producido y comercializado por Beckman Coulter, Inc.

La figura 10 ilustra una vista en sección transversal a través de la zona Z de detección de partículas de una celda 30 de flujo óptico de cuatro lados monolítica fabricada mediante el método de la invención y útil en una realización de la instrumentación de la figura 1 que se basa únicamente en propiedades ópticas de cuerpos formados (por ejemplo BC2) para diferenciar subpoblaciones, por ejemplo, el citómetro de flujo de fluorescencia FC500 producido y comercializado por Beckman Coulter, Inc. En esta realización se adquieren parámetros ópticos a partir de cuerpos formados que transitan por un canal de flujo rectangular ubicado fuera del eje de celda de flujo. Se han producido canales prismáticos experimental de 140 por 320 micrómetros mediante el método de la invención, en una envolvente de celda de flujo definida por superficies 50 planas exterior que proporcionan dos lados de 3,6 mm de anchura y dos lados de 5,0 mm de anchura. En tales celdas de flujo, una ventana delgada permite la recogida de radiación de fluorescencia, excitada mediante el haz B de láser, hasta el ángulo crítico determinado por la diferencia de índice de refracción a través de la interfaz de vidrio/aire con óptica de recogida más pequeña, tal como la lente 51 en la figura 1, de menor coste que lo necesario con grosores de pared de celda de flujo típicos. Pueden adquirirse de manera convencional señales de dispersión frontal (FS) u otros parámetros ópticos [por ejemplo, una segunda señal de fluorescencia (F2) o una señal de dispersión lateral (SS)].

La figura 11 ilustra una sección longitudinal a través de la abertura JA de expulsión de chorro de una celda 30 de flujo óptico monolítica fabricada a partir de la celda 30 de flujo monolítica en la figura 9 mediante métodos usados para formar el conducto Z de volúmetro de la celda 30 de flujo en la figura 2. Esta realización es útil en un citómetro de flujo que se basa únicamente en propiedades ópticas de cuerpos formados (por ejemplo, BC1-BC3) que pasan en orden a través del haz B de láser para diferenciar y clasificar subpoblaciones seleccionadas según sus parámetros distintivos. Los elementos en la figura 11 marcados de manera idéntica a los de la figura 2 funcionan de la misma manera, es decir, se proyecta una corriente 74 de muestra hacia JA mediante el canal C1 en la boquilla 56 y se rodea por un líquido S1 de protección en el paso 33 tal como se ha descrito. El paso 33 difiere del paso 32 de la figura 2 por tener una perforación 54 más larga a través de la superficie 36 de extremo superior, de modo que la porción de canal cuadrado original que forma la abertura JA de expulsión de chorro está ubicada cerca de la superficie 36 de extremo inferior, que no está unida a elementos fluidicos de instrumento. La abertura JA de expulsión de chorro tiene 75 por 75 micrómetros y aproximadamente 500 micrómetros de longitud entre las superficies 55 y 57 de revolución y está dentro de una envolvente cuadrada que comprende superficies 50 planas que tienen 2,4 mm de anchura por 6 mm de longitud. Una corriente 76' compuesta de corrientes de protección y de muestra central sale a través de la abertura JA de expulsión de chorro para formar un chorro en el aire. Entonces pueden desviarse de manera electrostática gotitas que contienen cuerpos formados deseados de manera convencional según los parámetros detectados mediante métodos de transducción óptica convencionales. Aunque se muestra que el haz B de láser interseca la corriente de muestra por encima de la abertura JA de expulsión de chorro, puede resultar ventajoso en algunas aplicaciones acoplar el haz B de láser a través de la pared de celda de flujo que rodea la abertura tal como se describe para la instrumentación de la figura 1, de modo que se produce detección óptica dentro de la propia abertura de expulsión de chorro.

Las figuras 12A, 12B y 12C ilustran diferentes aspectos de una celda 90 de flujo óptico monolítica fabricada esmerilando y puliendo una envolvente que tiene una superficie 96 de revolución no cíclica central, preferiblemente coaxial con el canal 93 de flujo prismático; más allá de la superficie de revolución deseada, se retira material para formar cilindros 92 de soporte solidarios, también coaxiales con el eje del canal 93 de flujo. Preferiblemente, dichas superficies se generan tal como se conoce en la técnica de elaboración del vidrio montando una longitud de una estructura estirada apropiada, producida mediante el método anteriormente descrito y más larga que la longitud deseada de la celda 90 de flujo, entre los centros y retirando la longitud en exceso para formar superficies 91 de extremo una vez sometida la superficie 96 a acabado según se requiere. Preferiblemente, se produce una parte 97 plana para acoplar un haz de láser en la porción 99 de detección del canal 93 de flujo como parte plana de referencia antes de estirar la preforma, tal como se ha descrito, y se proporciona un pulido óptico una vez generada la superficie 96 pero antes de retirar cualquier longitud en exceso para formar superficies 91 de extremo. La figura 12A es una vista en perspectiva de una celda 90 de flujo de este tipo adecuada para su uso en instrumentación que se basa únicamente en parámetros ópticos para la diferenciación de tipos de cuerpos formados. La figura 12B ilustra una sección longitudinal axial de una celda de flujo óptico similar que comprende un conducto de volúmetro central

para la determinación simultánea de propiedades tanto ópticas como de V y/o C de Coulter; producido tal como el conducto Z de volúmetro en la figura 2, el paso 93' comprende perforaciones 94 a partir de las superficies 91 de extremo y superficies 95 de revolución de transición desde las perforaciones hasta el conducto 99 de volúmetro en la figura. La figura 12C es una sección transversal a través de la zona de detección de partículas de la celda de flujo en la figura 12A o 12B. El haz B de láser entra en la celda 90 de flujo mediante la parte 97 plana e interacciona con cuerpos formados dentro de la zona 99 de detección de partículas. Debido a la diferencia relativamente pequeña en el índice de refracción entre líquidos de suspensión y sílice, la luz dispersada a partir del haz B de láser mediante cuerpos formados, o emitida a partir de restos de fluorescencia usados para marcar alguna población de cuerpos formados, se desviará ligeramente tal como para celdas de flujo que tienen envolventes que comprenden ventanas planas en el cruce de la superficie plana del canal 93 de flujo en la figura 12A o el conducto 99 de volúmetro de la figura 12B. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 12C, tal luz no se desviará por refracción al pasar a través de la envolvente formada por la superficie 96 de revolución, mientras que luz que pasa de manera similar a través de una envolvente que comprende superficies planas se desvía por refracción según la diferencia relativamente grande en el índice entre sílice y aire tal como se muestra en las figuras 4, 10 y 13. Por consiguiente, celdas de flujo tales como 90 en las figuras 12A y 12B ofrecen una eficiencia de recogida mayor y por tanto ventajas cuando deben detectarse niveles de luz bajos. Se han fabricado celdas de flujo que tienen una superficie 96 de revolución esférica con un radio de 3,2 mm y una longitud de 9,5 mm entre las superficies 91 de extremo mediante los métodos dados a conocer en el presente documento.

Tal como se indicó en la porción introductoria de esta solicitud, determinadas desventajas son inherentes en celdas de flujo óptico compuestas producidas uniendo componentes complementarios para lograr celdas de flujo óptico que tienen un canal de flujo o conducto de volúmetro de sección transversal poligonal en el que se detectan propiedades de partículas. También se indicó en esa parte cómo celdas de flujo óptico monolíticas que tienen un canal de flujo cilíndrico y una envolvente coaxial, producidas como tubos de pared gruesa estirados a partir de una preforma sobredimensionada, evitan tal desventaja, pero inducen aberraciones en parámetros ópticos adquiridos a través de la pared que rodea la zona de detección de partículas. Los párrafos inmediatamente anteriores a éste describen cómo el presente método inventivo de fabricación de celdas de flujo evita las desventajas anteriormente mencionadas de celdas de flujo compuestas y reduce las desventajas ópticas de celdas de flujo cilíndricas. Sin embargo, hay ventajas significativas adicionales de zonas de detección de partículas que tienen la sección transversal poligonal comprendida dentro de celdas de flujo óptico realmente monolíticas del tipo descrito en el presente documento. Estas ventajas se originan a partir de la eliminación de imperfecciones en las uniones usadas para ensamblar celdas de flujo compuestas que tienen canales de flujo o conductos de volúmetro no cilíndricos tal como se describe en la patente '652 o en la solicitud de patente estadounidense 2007/0085997 y sus precursores. Tales uniones se han producido mediante el uso de adhesivos, procedimientos de unión de vidrio a baja temperatura usando agentes químicos o vidrios para soldadura, o procedimientos de fusión a alta temperatura en los que se colocan en estrecha proximidad superficies de los componentes complementarios que van a unirse y se calientan suficientemente como para hacer que esas superficies se reblandezcan y se unan entre sí. Las uniones formadas mediante los dos primeros métodos son significativamente menos duraderas que las formadas mediante fusión de los componentes complementarios y pueden dar como resultado fluorescencia de fondo que interfiere con la radiación fluorescente débil emitida por cuerpos formados que transitan por la zona de detección de partículas resultante; además, los agentes de unión pueden extender o dejar un residuo más allá de las superficies mecanizadas destinadas a definir la geometría de esquina de la zona de detección de partículas y por tanto provocan una variabilidad de unidad a unidad impredecible en el flujo de fluido a través de la zona de detección. Alternativamente, agente de unión insuficiente puede llenar el hueco entre componentes adyacentes de la celda de flujo compuesta, dejando un hueco vacío que se extiende entre tales componentes a lo largo de la longitud de la esquina que estaban destinados a formar estos componentes. Fuerzas viscosas que actúan sobre superficies adyacentes de canales de flujo no cilíndricos se combinan de tal manera que flujos de fluido cerca de las esquinas experimentan resistencia adicional, y por tanto velocidades de flujo más lentas, que cerca de las porciones centrales de las superficies. Por consiguiente, cuerpos formados fuera del flujo casi axial en canales no cilíndricos experimentan velocidades de flujo inferiores y pueden migrar al interior de las esquinas de tales canales de flujo, por ejemplo, durante transiciones de flujo requeridas para la purga de una muestra a partir del, y la introducción de una muestra diferente al interior del, paso 32 en las figuras 2 y 3. Debido a las pequeñas dimensiones de conductos de volúmetro y la mayor dificultad para purgarlos exhaustivamente, esta posibilidad es muy preocupante cuando se adquieren parámetros de V y/o C de Coulter y, tal como se describió anteriormente, requiere una complejidad adicional en el conjunto T de transductor de la instrumentación de la figura 1. Los cuerpos formados típicos tienen como máximo varios micrómetros de dimensión y por tanto pueden secuestrarse en tales intersticios en uniones imperfectas durante tales transiciones. Al reanudar el flujo continuo las velocidades de flujo bajas inducidas por viscosidad cerca de esquinas de canal pueden ser insuficientes para barrer hacia fuera la totalidad de tales células secuestradas, permitiendo el posible arrastre de cuerpos formados de una muestra a una muestra posterior. Si tal cuerpo formado secuestrado es de los tipos de célula poco frecuentes críticos para el diagnóstico, no sólo estará ausente de la primera muestra, sino que puede producirse en una siguiente muestra normal. Puede producirse como resultado información de diagnóstico errónea a partir del procesamiento posterior de parámetros adquiridos a partir de ambas muestras, por tanto el arrastre de cuerpos formados de una muestra de paciente a otra muestra de paciente plantea graves preocupaciones normativas y de responsabilidad. Debido a la dificultad (comentada anteriormente) para purgar los pequeños conductos de volúmetro requeridos para detectar parámetros de V y/o C de Coulter, la instrumentación que usa celdas de flujo compuestas que comprenden tales conductos y que incluyen

uniones de fusión está sujeta a este último fallo y también a sus implicaciones. Con respecto a las celdas de flujo cilíndricas monolíticas anteriormente mencionadas se observó que éstas se formaban fácilmente porque la forma de canal era la forma de energía mínima para el vidrio reblandecido tal como sea necesario para la operación de estirado. También se aplican consideraciones de energía mínima durante la unión de componentes complementarios y, durante la operación de fusión, dan como resultado el redondeo de la intersección de las superficies que van a unirse y las superficies destinadas a formar el canal de flujo no cilíndrico. Por tanto, por ejemplo, en celdas de flujo tales como las usadas en la instrumentación experimental descrita en la patente '652 (por ejemplo, la celda 30 de flujo en la figura 13), los bordes de las dos placas de separación (por ejemplo, CC2 y CC4 en la figura 13) se reblandecen y redondean aproximadamente alrededor de un centro dentro de las placas de separación antes de que el vidrio a granel se reblandezca suficientemente como para unir las superficies que van a unirse; tal redondeo está indicado para un borde de este tipo de CC4 mediante Rⁿ en la figura 13, pero se aplica a ambos bordes de este tipo de las placas CC2 y CC4 de separación. Tal como se indica en la figura 13, la sección transversal del conducto Z de volúmetro resultante no es realmente rectangular, sino que más bien tiene impuestos en dichas cuatro esquinas intersticios adyacentes a las dos placas de ventana (por ejemplo, CC1 y CC3 en la figura 13) y que se extienden hacia atrás desde la esquina prevista varios micrómetros. Se han observado intersticios que se extienden más de 15 micrómetros desde el canal de flujo y a lo largo de gran parte de la longitud de celda de flujo en celdas de flujo planarizadas comerciales en dicha instrumentación de la patente '652; estos tienen un radio perceptible de varios micrómetros en ambas esquinas de ambas placas de separación. Tales intersticios llevan consigo la posibilidad anteriormente mencionada de arrastre de cuerpos formados. Tal como se muestra en la figura 4, en las celdas de flujo óptico realmente monolíticas de la presente invención consideraciones de energía mínima dan como resultado que las esquinas de la porción Z de detección de partículas del paso 32 en las figuras 2 y 3 tienen un radio interno R y superficies planas, mediante lo cual se elimina la posibilidad de intersticios y arrastre asociado junto con las preocupaciones normativas y de responsabilidad asociadas. Tal formación de radio también reduce la porción de la sección transversal de canal responsable de la peor ralentización inducida por la viscosidad del flujo pasante del canal, facilitando también de ese modo la purga de cuerpos formados en una muestra analizada antes de la introducción de una muestra diferente cuando se usan tales celdas de flujo en la instrumentación de la figura 1.

La invención se ha descrito en detalle haciendo referencia a determinadas realizaciones preferidas. Por ejemplo, aunque es preferible que el paso 32 sea central y esté ubicado a lo largo del eje longitudinal A del elemento 30 óptico, algunas aplicaciones se benefician de que el paso ni sea central ni esté a lo largo de dicho eje. Por ejemplo, los elementos 30 ópticos monolíticos se han producido para su uso en citómetros de flujo que tienen un paso rectangular desviado hacia una pared con el fin de mejorar la eficiencia de recogida de fluorescencia o coincidir mejor con la longitud de trayecto óptico a través de la pared con lentes de recogida disponibles.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una celda (30, 30', 30", 90) de flujo óptico monolítica, transparente, del tipo usado para caracterizar cuerpos formados que pasan a través de la misma, teniendo dicha celda (30, 30', 30", 90) de flujo óptico formado en la misma un canal (Z, Z', 93) de flujo interno prismático definido por al menos tres superficies (64) sustancialmente planas intersecantes, mediante lo cual dicho canal de flujo óptico tiene una sección transversal que tiene forma sustancialmente poligonal, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) proporcionar una preforma monolítica que comprende un tubo de vidrio de pared gruesa de material silíceo que tiene un canal central prismático que se extiende axialmente a través del mismo, mostrando dicho canal una sección transversal sustancialmente uniforme de una forma poligonal deseada;
 - (b) calentar dicha preforma hasta una temperatura predeterminada por encima de la temperatura de reblandecimiento de dicho tubo de vidrio;
 - (c) estirar axialmente dicha preforma a una tasa controlada, durante un tiempo controlado y a una orientación angular constante, para lograr un área de la sección transversal deseada de dicho canal prismático.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de lapear una superficie (50) plana sobre la superficie (50) exterior de dicho tubo de vidrio antes de la etapa (b), siendo dicha superficie plana sustancialmente paralela a una de las superficies (64) planas que definen dicho canal (Z, Z', 93) interno prismático.
3. Método según la reivindicación 2, que comprende además la etapa de enfriar dicha preforma después de la etapa (c) y usar dicha superficie (50) plana sobre la superficie exterior de la preforma estirada como superficie de referencia para producir superficies (50) planas adicionales sobre la preforma estirada que son paralelas a las otras superficies (64) planas que definen el canal (Z, Z', 93) prismático, mediante lo cual la superficie exterior de la estructura estirada puede dotarse de una sección transversal poligonal que tiene una forma similar a al menos una porción del canal (Z, Z', 93) prismático interior y es sustancialmente coaxial con el mismo.
4. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de formar una superficie (96) de revolución no cilíndrica sobre al menos una porción de la superficie exterior de la estructura estirada.
5. Método según la reivindicación 2, que comprende además la etapa de formar una superficie (96) de revolución no cilíndrica sobre al menos una porción de la superficie exterior de la estructura estirada de tal manera que una porción residual de dicha superficie plana proporciona una ventana plana en la superficie (96) de revolución.
6. Método según la reivindicación 1, en el que dicha área de la sección transversal del canal (Z, Z', 93) que se extiende axialmente en la preforma de vidrio se contrae en un factor de al menos 1000 durante dicha etapa de estirado.
7. Método según la reivindicación 1, en el que dicha preforma monolítica se produce (a) deslizando un tubo (T1) de vidrio sobre un mandril (M) alargado que tiene una sección transversal poligonal deseada, teniendo dicho tubo (T1) secciones transversales interna y externa concéntricas de forma circular centradas en un eje longitudinal, (b) calentando dicho tubo (T1) de vidrio y conjunto (M) de mandril hasta una temperatura por encima de la temperatura de reblandecimiento del tubo (T1) de vidrio mientras que de manera simultánea se hace rotar dicho tubo (T1) y conjunto (M) de mandril alrededor del eje longitudinal de dicho tubo, mediante lo cual la sección transversal del tubo interior se adapta a la sección transversal poligonal de dicho mandril, y la sección transversal del tubo exterior sigue siendo sustancialmente circular, y (c) retirando dicho mandril (M) del tubo interior.
8. Método según la reivindicación 6, en el que se deslizan tubos adicionales de material de vidrio sobre un tubo anterior para aumentar el grosor de pared de preforma antes de las etapas de calentamiento y estirado y, después de posicionar de ese modo cada funda adicional, se calienta la estructura por encima de la temperatura de reblandecimiento del material de vidrio, fusionando de ese modo los materiales de funda entre sí para formar una estructura monolítica.
9. Celda (30, 30', 30", 90) de flujo óptico para su uso en un citómetro de flujo del tipo adaptado para caracterizar cuerpos formados basándose al menos en sus propiedades ópticas respectivas, comprendiendo dicha celda (30, 30', 30", 90) de flujo una estructura monolítica sin interrupciones de material silíceo ópticamente transparente, definiendo una porción de dicha estructura monolítica un canal (Z, Z', 93) prismático a través del cual puede hacerse que pasen cuerpos formados mientras se irradian mediante radiación óptica que pasa a través de dicha estructura, teniendo al menos una porción axial de dicho canal (Z, Z', 93) de flujo una sección transversal de forma poligonal, mediante lo cual la radiación

óptica que pasa a través de dicha estructura puede irradiar cuerpos formados dentro de dicho canal (Z, Z', 93) de flujo, y la radiación óptica resultante de dicha irradiación sale de dicho canal de flujo a través de diferentes superficies (64) planas que definen dicho canal prismático.

- 5 10. Celda (30, 30', 30", 90) de flujo óptico según la reivindicación 9, en la que dicho canal (Z, Z', 93) prismático tiene de tres a ocho lados (64).
11. Celda de flujo óptico según la reivindicación 9, en la que
- 10 (a) la envolvente exterior de la estructura monolítica también tiene forma prismática, siendo el número de lados de prisma igual al número de lados del canal de flujo y sustancialmente paralelos a los mismos, mediante lo cual se proporciona una pluralidad de ventanas planas a través de las cuales puede entrar y salir radiación del canal de flujo;
- 15 (b) la envolvente exterior de la estructura monolítica está dotada de lados (50) planos adicionales paralelos a diferentes lados (64) del canal (Z, Z', 93) prismático, proporcionándose de ese modo una pluralidad de ventanas planas a través de las cuales puede entrar y salir radiación del canal de flujo; o
- 20 (c) al menos una porción de la envolvente exterior de la estructura monolítica tiene forma esférica para permitir que salga radiación de la celda (30, 30', 30", 90) de flujo con desviación mínima debida a refracción en el límite de envolvente.
12. Celda de flujo óptico según la reivindicación 9, en la que la estructura monolítica se produce mediante un procedimiento de calentamiento/estirado.
- 25 13. Uso de la celda de flujo óptico de las reivindicaciones 9 a 12, en un método para diferenciar cuerpos formados en una muestra líquida, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar una celda (30, 30', 30", 90) de flujo óptico monolítica sin interrupciones que tiene al menos tres paredes (64) planas diferenciadas que definen un canal (Z, Z', 93) de flujo de sección transversal poligonal central; (b) hacer pasar cuerpos formados en orden a través del canal (30, 30', 30", 90) de flujo mientras se irradian tales
- 30 cuerpos formados con un haz de radiación que pasa a través de una de tales paredes (64); (c) detectar diferentes parámetros ópticos de los cuerpos formados irradiados a través de al menos dos de dichas paredes (64).
- 35 14. Uso de la celda (30, 30', 30", 90) de flujo óptico de las reivindicaciones 9 a 12, según la reivindicación 13, en el que dicha celda de flujo óptico monolítica tiene al menos cinco paredes (50) planas diferenciadas y en el que la radiación de dispersión frontal a partir de los cuerpos formados irradiados se detecta a través de dos de dichas paredes, y la fluorescencia emitida a partir de los cuerpos formados irradiados se detecta a través de otras dos de dichas paredes.
- 40 15. Uso de la celda (30, 30', 30", 90) de flujo óptico de las reivindicaciones 9 a 12, según la reivindicación 14, en el que dichas mediciones de dispersión de luz y fluorescencia se combinan con mediciones de volumen V y/o conductividad C de Coulter realizadas de manera simultánea en cuerpos formados que pasan en orden a través de dicho canal (Z, Z', 93) de flujo para diferenciar adicionalmente cuerpos formados.

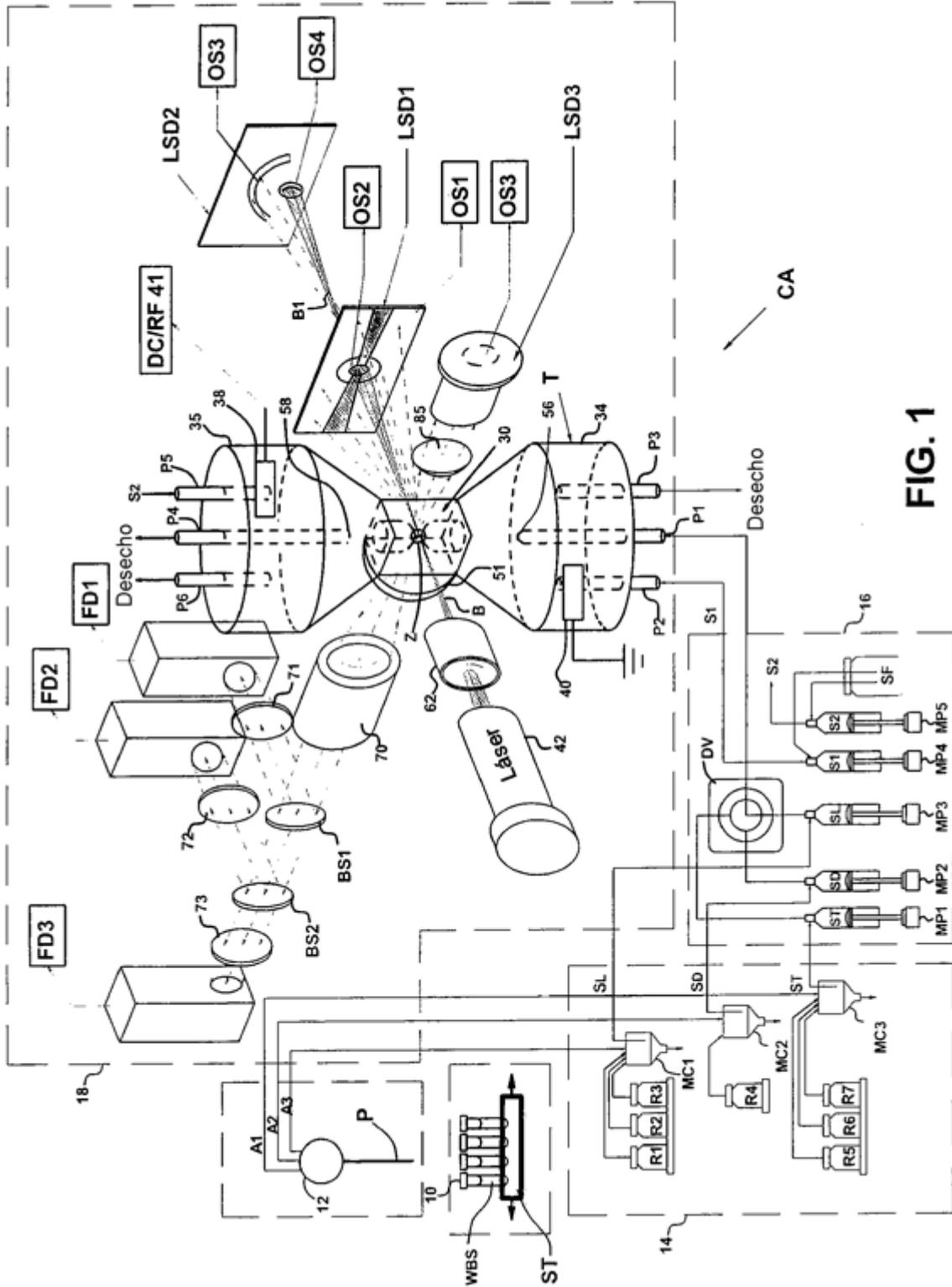


FIG. 1

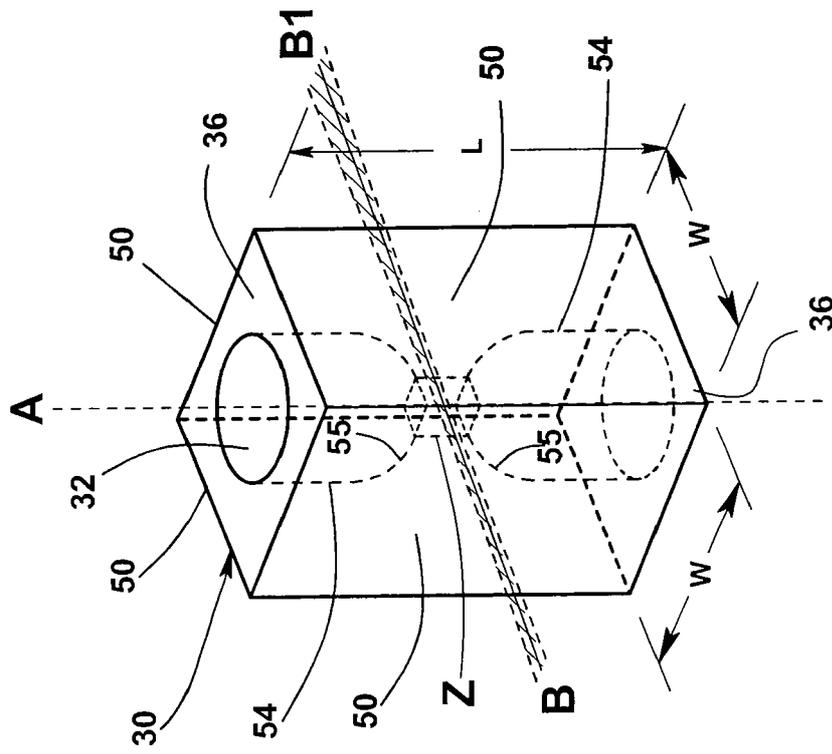


FIG. 2

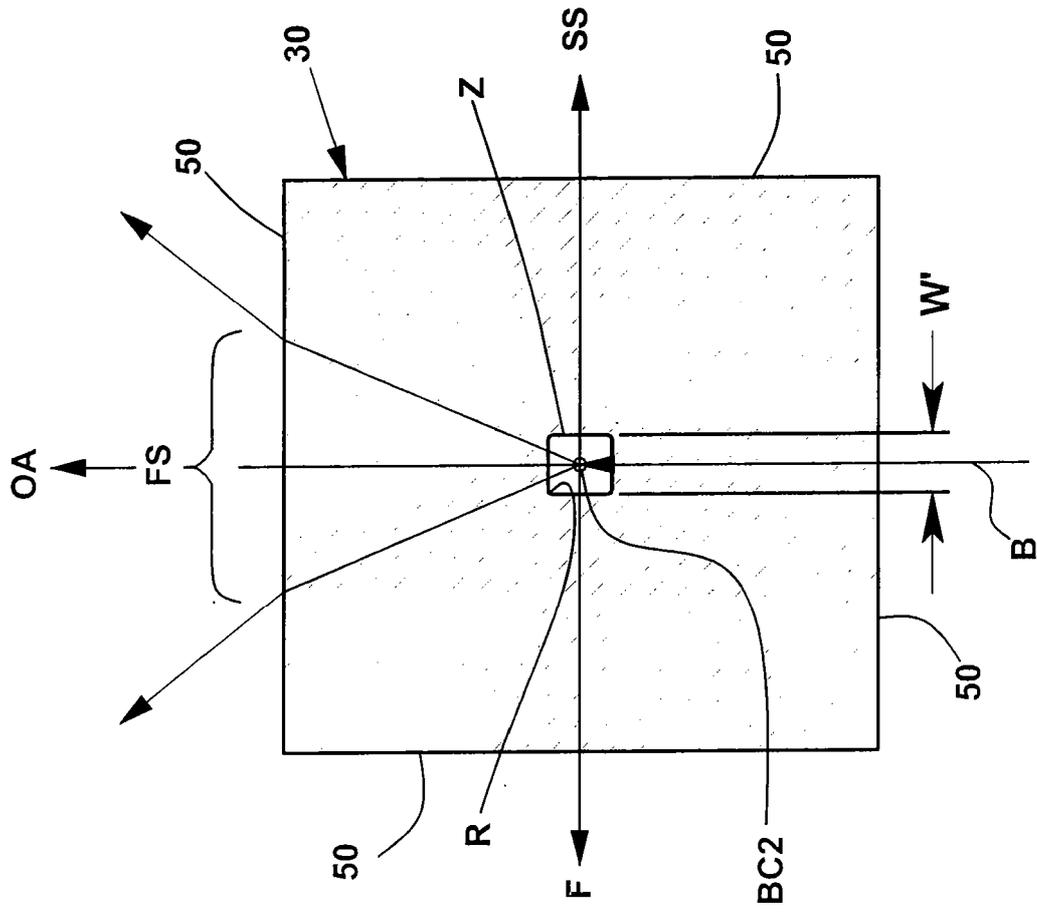


FIG. 4

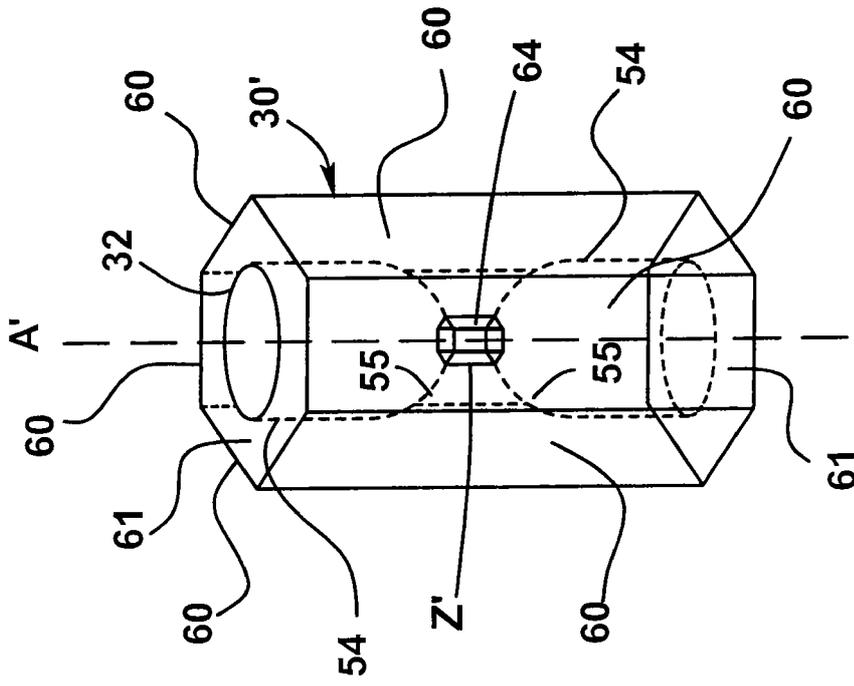


FIG. 5

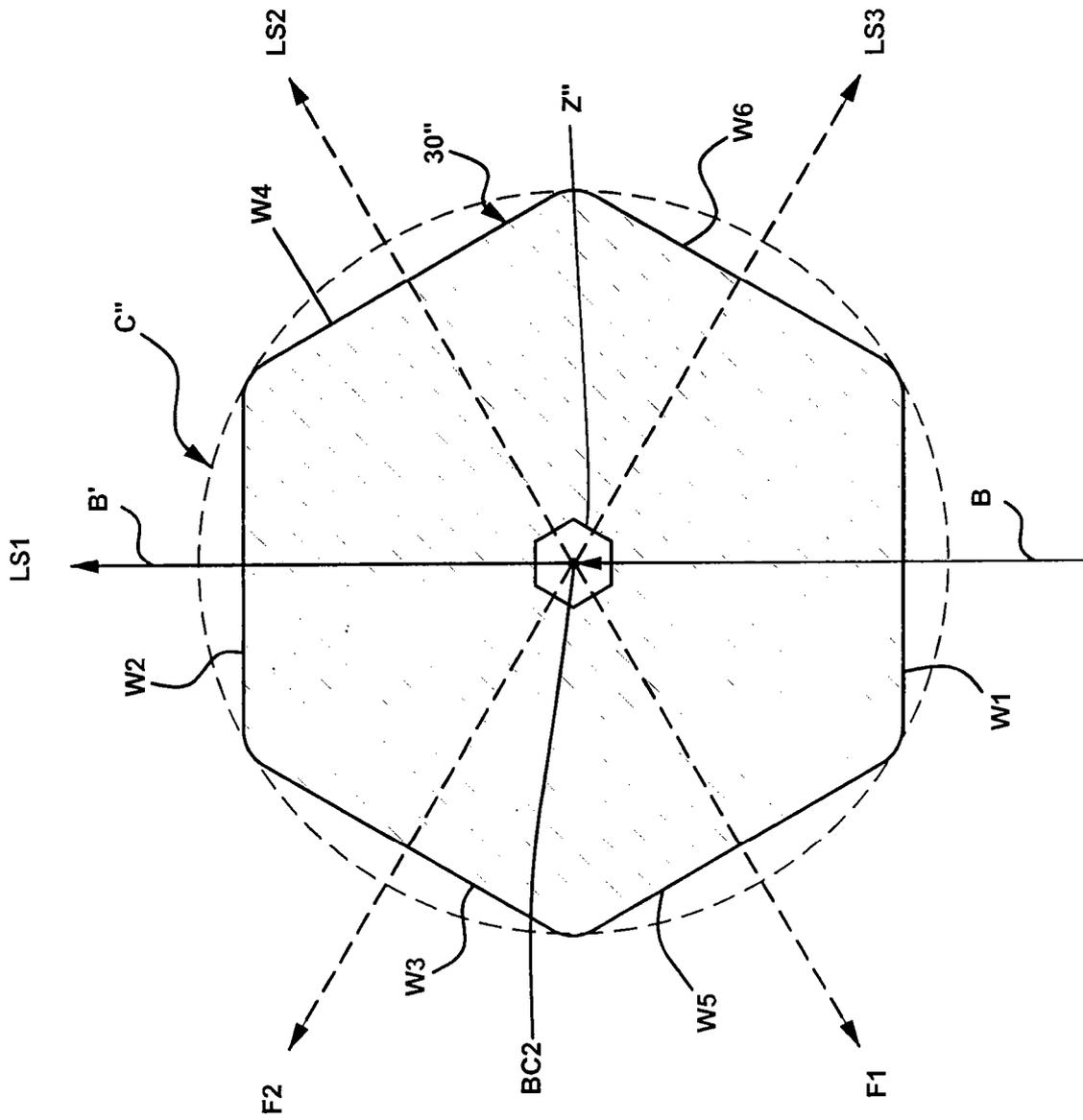


FIG. 6

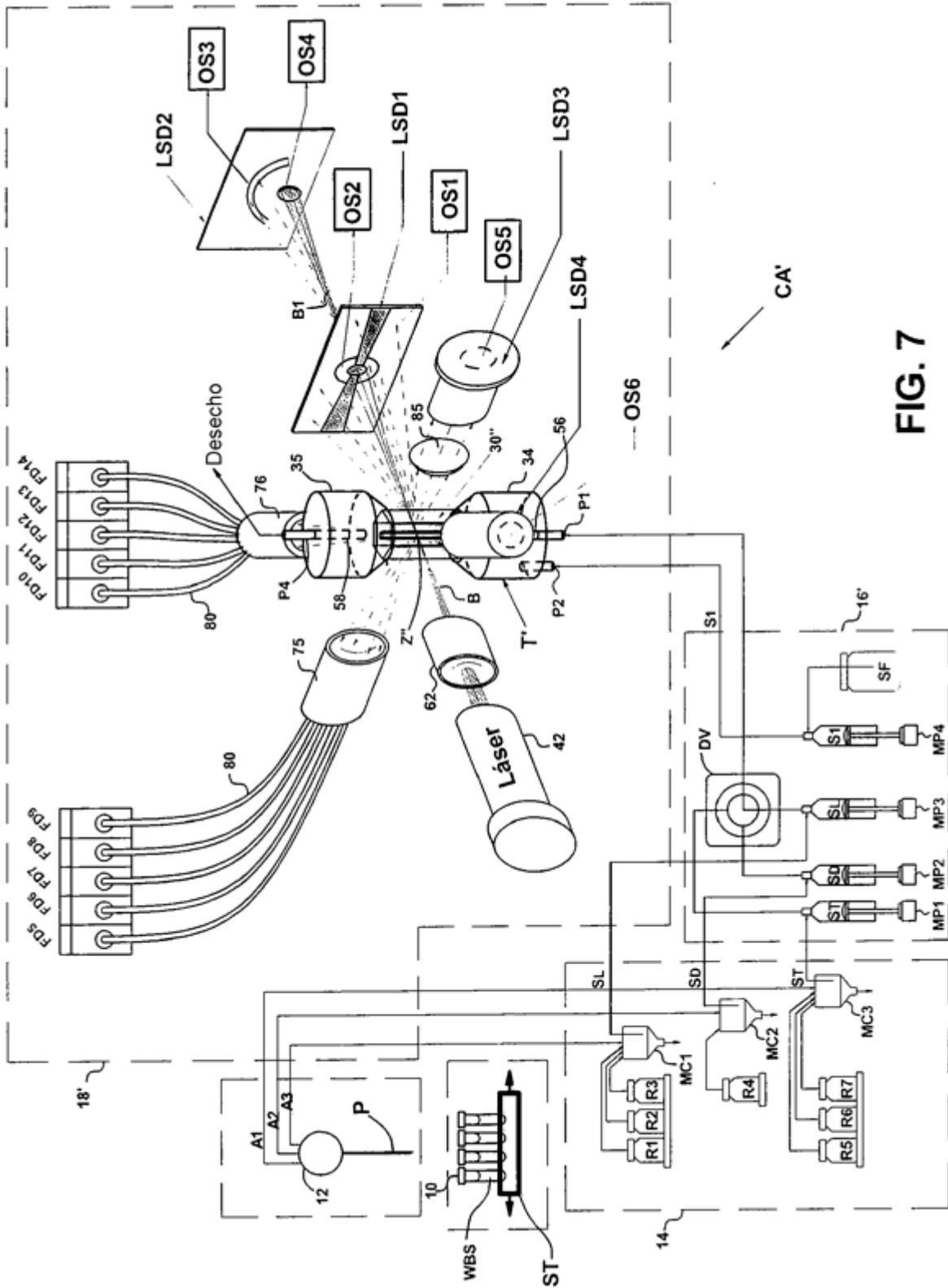


FIG. 7

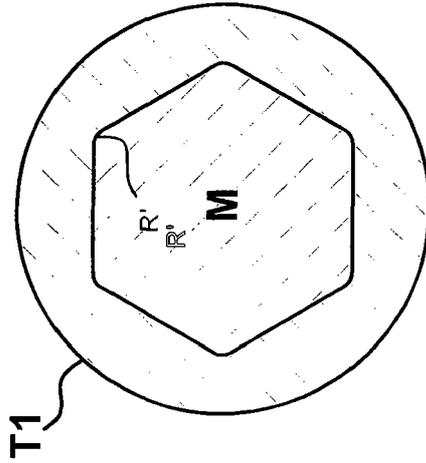


FIG. 8A

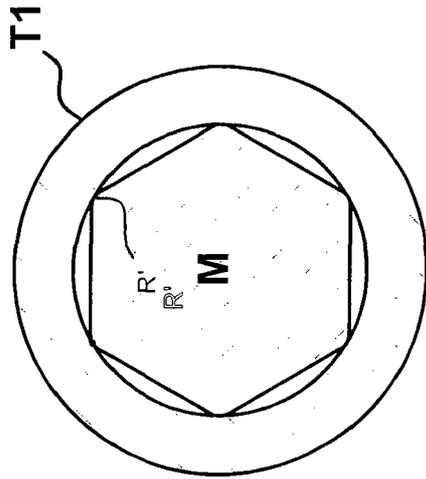


FIG. 8B

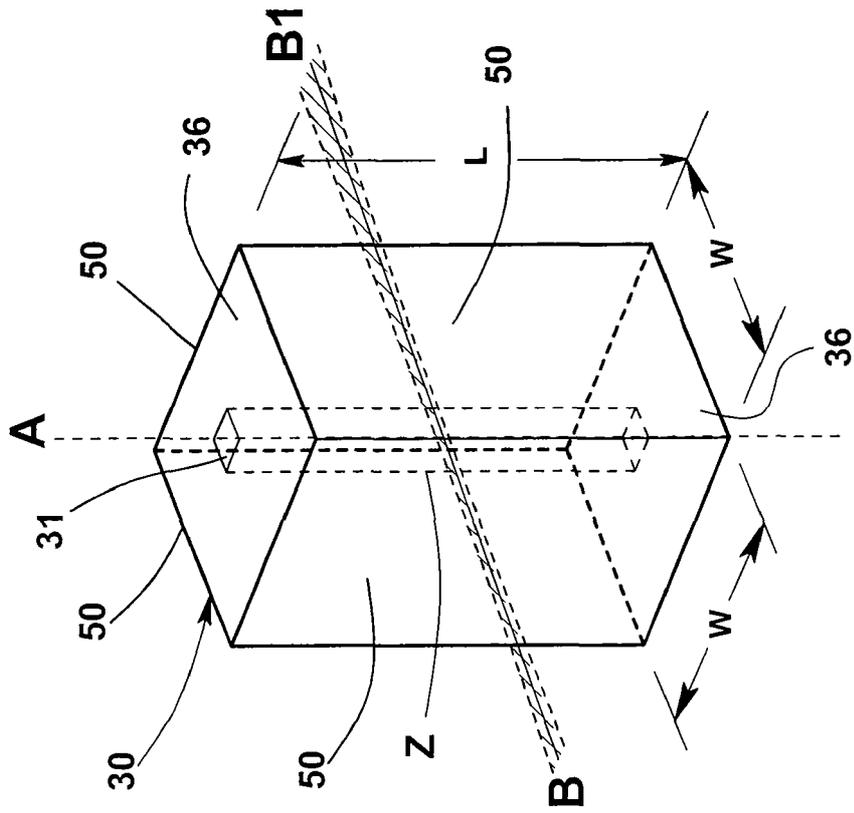


FIG. 9

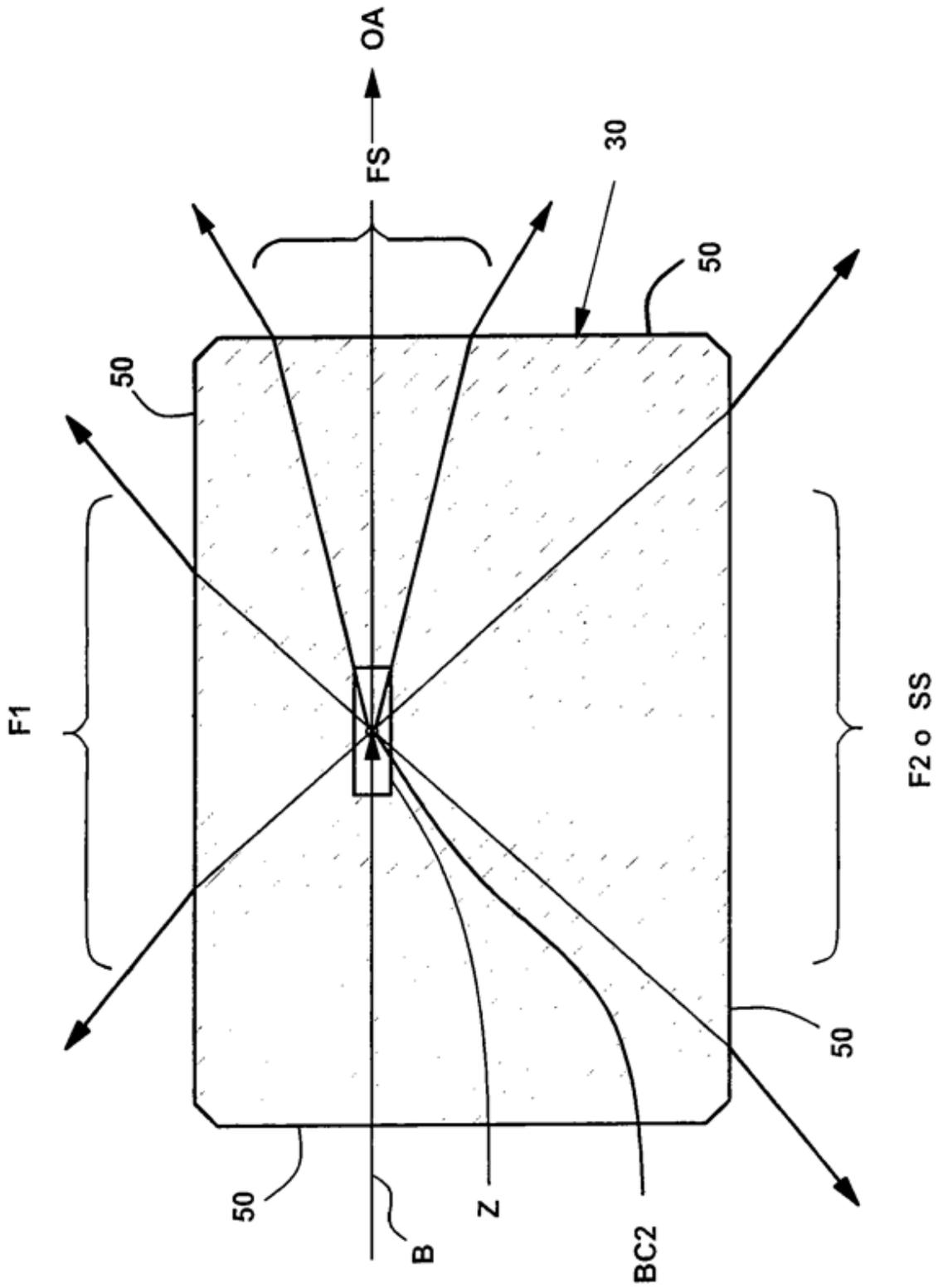


FIG. 10

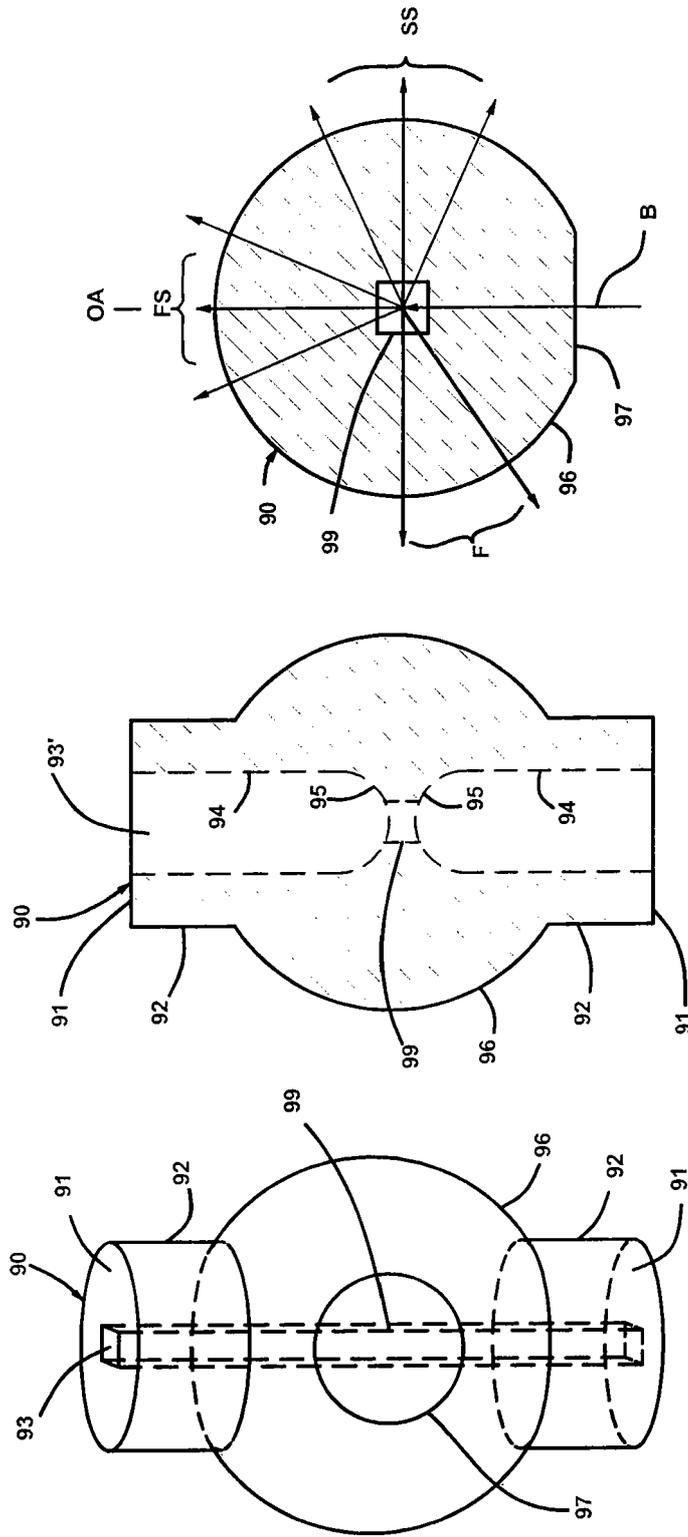


FIG. 12C

FIG. 12B

FIG. 12A

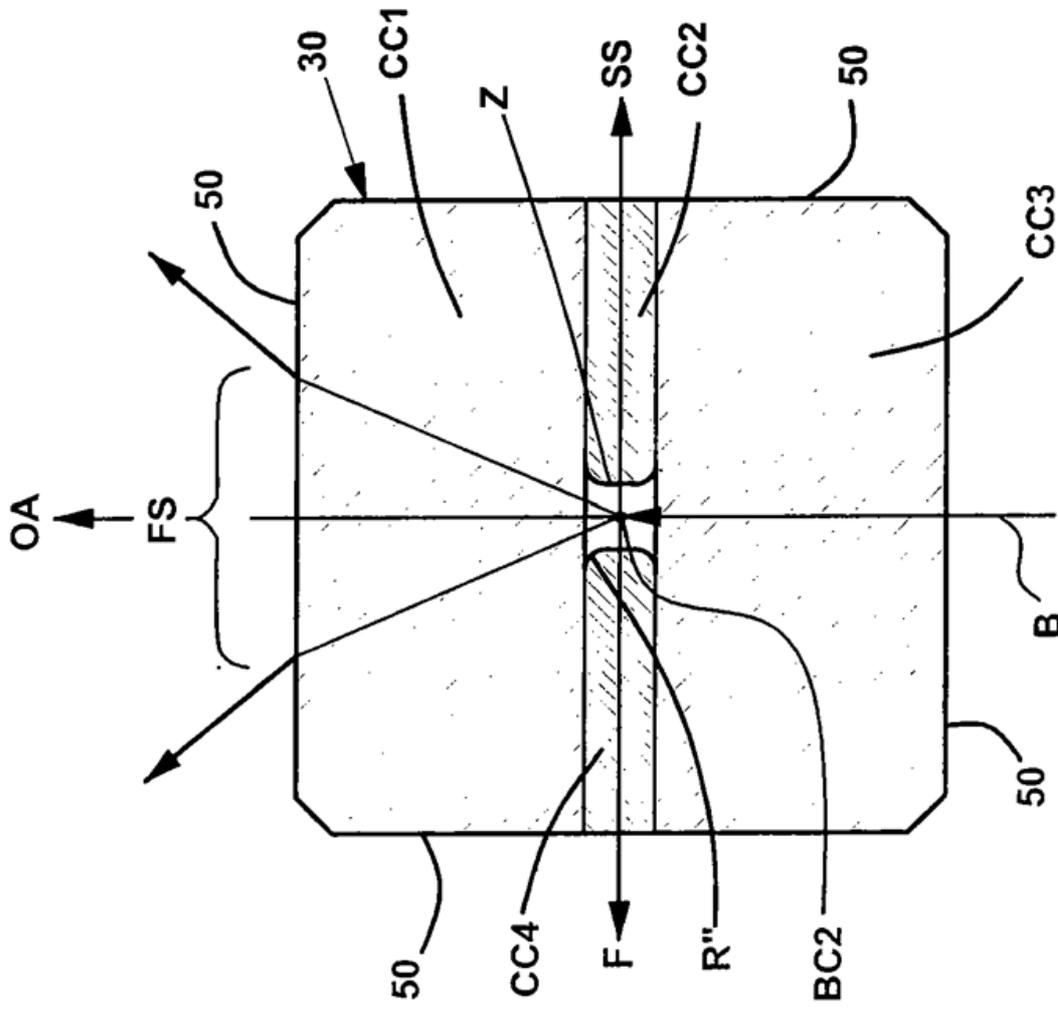


FIG. 13

(TÉCNICA ANTERIOR)