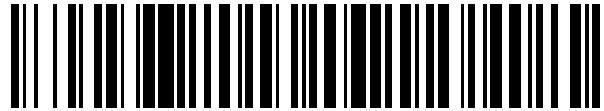


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 126**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2005 E 05775671 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 1771729**

54 Título: **Mejora de la discriminación en citometría de flujo con transformación geométrica**

30 Prioridad:

27.07.2004 US 591957 P

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

29.12.2015

73 Titular/es:

**BECKMAN COULTER, INC. (100.0%)
250 S. KRAEMER BOULEVARD
BREA, CA 92821 , US**

72 Inventor/es:

**MALACHOWSKI, GEORGE C.;
PURCELL, PAUL, BARCLAY y
STANTON, EDWARD**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 555 126 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

Mejora de la discriminación en citometría de flujo con transformación geométrica

5 Campo técnico

La presente invención incluye métodos y aparatos para la discriminación en tiempo real de las partículas y su separación mediante citometría de flujo. Más concretamente, las realizaciones de la invención incluirían la aplicación de diversas operaciones matemáticas para manipular datos en tiempo real que mejoren la discriminación entre poblaciones de partículas.

Antecedentes de la invención

Uno de los principales avances de los últimos años ha sido la aplicación de separadores de chorro de aire de alta velocidad para discriminar partículas y células con diferencias casi imperceptibles entre ellas. Por ejemplo, la citometría de flujo se puede utilizar para separar los espermatozoides portadores del cromosoma Y de los que llevan el cromosoma X. Aunque en este contexto se discuten algunas propiedades, debe entenderse que este es solo un ejemplo entre un amplio abanico de aplicaciones. La separación de espermatozoides se ha aplicado por el momento en bóvidos, caballos y cerdos, pero podría utilizarse con otros animales. Dentro de esta misma aplicación, se podrían obtener espermatozoides viables y móviles del semen o posiblemente garantizar el sexo de la descendencia mediante el uso de espermatozoides sexados para inseminar a las hembras de una determinada especie. Su finalidad podría ser la mejora de la cría de animales. Por ejemplo, en ganaderías vacunas cuya producción es fundamentalmente láctea, sería preferible la selección de hembras, mientras que si se trata de producción cárnica, podrían ser preferibles los machos.

Puede haber diferencias sutiles incluso de orden cuantitativo; por ejemplo, que los espermatozoides no expresen antígenos de superficie indicadores de la presencia de cromosomas X o Y. Sin embargo, los espermatozoides portadores del cromosoma X podrían tener mayor masa de material genético. Un colorante, como puede ser el Hoechst, podría tener propiedades de unión al ADN. En consecuencia, la luz emitida por los espermatozoides portadores del cromosoma X cuando incide sobre ellos el láser ultravioleta sería ligeramente más brillante, lo cual podría utilizarse para la discriminación y separación de los espermatozoides.

También puede haber diferencias sutiles debidas a las geometrías del citómetro de flujo; siguiendo con el ejemplo de los espermatozoides, en los mamíferos suelen tener forma de pala y, cuando pasan a través del citómetro de flujo, pueden adquirir una orientación aleatoria. Esta orientación puede oscurecer la luz diferencial procedente de las células portadora del cromosoma X o Y. Por tanto, un citómetro podría contar con una boquilla de orientación especializada que utilice un efecto hidrodinámico para orientar las células en un grado razonable.

Se podría obtener un histograma bivariante, cuyos parámetros serían la fluorescencia frontal y lateral. La población puede mostrar el efecto de la orientación. Una separación escasa de dos poblaciones podría dificultar el trazado de un contorno cerrado alrededor de cada población. Dicho contorno puede ser necesario para establecer una región que pueda separarse de forma exclusiva.

En W00032542A se describe un sistema para separar micropartículas en una muestra en la cual las micropartículas se han codificado con al menos dos atributos detectables; las señales relacionadas con cada uno de los atributos se detectan y transforman en datos bidimensionales que se muestran en un gráfico para diferenciar poblaciones distintas dentro de la muestra, utilizando regiones poligonales alrededor de las poblaciones del gráfico y un citómetro de flujo. En US-6662117B se describe un analizador de partículas y un método para clasificar partículas en el cual estas se caracterizan mediante al menos dos parámetros detectables; las señales relacionadas con cada uno de los atributos se detectan y transforman en datos bidimensionales; los datos bidimensionales se someten a traslación y rotación y después se muestran en un diagrama de dispersión, en el cual hay al menos dos poblaciones distinguibles con fines de clasificación utilizando una curva parabólica.

Divulgación de la invención

En consecuencia, conviene mejorar la discriminación entre partículas durante la citometría de flujo.

Los distintos aspectos de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una visión general de un proceso de separación de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención.

La Figura 2 muestra los sistemas de detección de la luz frontal y lateral de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención.

La Figura 3 es un ejemplo de un histograma de datos de separación de espermatozoides antes de la rotación.

La Figura 4 es un ejemplo de un histograma de los datos de separación de espermatozoides después del escalado.

5 La Figura 5 es un ejemplo de un histograma de los datos de separación de espermatozoides después de la rotación.

La Figura 6 es un ejemplo de un histograma de los datos de separación de espermatozoides después del escalado y la rotación.

10 La Figura 7 es una representación conceptual de un sistema para analizar los datos de la señal detectados en la realización.

Modo(s) de llevar a cabo la invención

15 Las realizaciones de la invención incluirían diversos métodos, aparatos, sistemas, etc. para distinguir partículas durante la citometría de flujo. En un citómetro de flujo se puede crear un flujo (1) de líquido que arrastre las partículas (2). En una realización, las partículas pueden ser espermatozoides; sin embargo, también es posible que sean otros tipos de partículas, todas las cuales se pretende incluir en la presente divulgación. Las partículas se acoplarían a un elemento emisor de luz; por ejemplo, una realización incluiría un colorante Hoechst. Cada
 20 partícula individual emitiría una primera señal y posiblemente al menos una señal adicional. Se colocaría también un detector (42) para captar las señales procedentes de las partículas, tal como se desprende de las Figuras 1 y 2. En las realizaciones, un detector de primera señal captaría una primera señal relacionada con una partícula individual y posiblemente al menos un detector de señales adicional detectaría como mínimo una señal adicional relacionada con una partícula individual. Esto incluiría cualquier tipo de señal que pudiera estar relacionada, quizá
 25 incluso estrechamente relacionada, con una partícula individual, tal como fluorescencia, radiancia o similares.

Como ejemplo, las Figuras 1 y 2 representan una visión general del proceso de separación mediante citometría de flujo. Una boquilla (32) permitiría que las partículas (2) arrastradas en un flujo (1) de líquido se movieran a través de un haz láser (34) en un punto de interrogación (33). Se colocaría un detector (42) de señales, tal como un detector
 30 (30) de difusión frontal y posiblemente un objetivo (31) para captar la difusión lateral, a fin de capturar las señales relacionadas con una partícula. También convendría colocar lentes (43) para enfocar el láser primario. En las realizaciones, las señales incluirían la fluorescencia emitida por una partícula emisora de luz acoplada a partículas individuales tras pasar a través de un haz láser. Las señales emitidas por una partícula pasarían a través de lentes y posiblemente de una banda perforada (44) para ayudar a recopilar los datos. Se conectaría un detector de señales a
 35 un sistema, como se comenta más adelante, en el cual se procesarían y analizarían los datos indicativos de las señales para determinar la decisión de separación. Una decisión de separación podría tomarse con ayuda de ordenadores y programación, equipos informáticos, software, y similares. Mientras se toma una decisión de separación, las partículas pasarían a través de un retardo (35) de gotas. Este espacio de tiempo puede ser muy corto. Tras realizar una decisión de separación, se aplicaría un pulso de carga (37) a una gotícula (23) que contiene
 40 una partícula. Las gotículas pasarían a través de electrodos deflectores (38) para separar las partículas en un receptáculo (40) deseado con recipientes separados. Las realizaciones incluirían un tubo (39) colector de desechos.

Para distinguir las partículas se analizarían los datos de la señal. Las realizaciones incluirían señales de conversión (p. ej., una primera señal y al menos una señal adicional) relacionadas con cada partícula individual a
 45 datos paramétricos n-dimensionales. Esto correría a cargo de un procesador de señales sensible a las señales. El procesador de señales permitiría una conversión de una primera señal y al menos una señal adicional en datos paramétricos n-dimensionales. Los datos paramétricos n-dimensionales incluirían datos unidimensionales o posiblemente multidimensionales (2D, 3D, 4D, etc.) que podrían asociarse con cada señal detectada. Los datos de las señales se convierten para relacionar cada señal con una coordenada, tal como una intensidad de un color o similar, y podrían incluso trasladarse a una gráfica en un sistema de coordenadas cartesianas.
 50

Las señales, posiblemente datos paramétricos n-dimensionales, se representarían en una gráfica (13). Como las diferencias entre partículas variarían ligeramente, las señales asociadas con las partículas también variarían ligeramente. Estas ligeras diferencias podrían ser tan pequeñas que, al representarlas gráficamente, los datos paramétricos n-
 55 dimensionales correspondientes a las señales se trasladarían a puntos situados muy próximos unos de otros. Podrían estar tan cerca que dificultarían la clasificación de los puntos de datos en una población. Las tecnologías convencionales ignorarían estos puntos situados tan cerca unos de otros y rechazarían esa partícula porque no podría distinguirse. En las realizaciones convendría reconfigurar los datos para mejorar la separación entre los puntos de datos.

60 Las realizaciones incluyen la distinción de al menos dos poblaciones (8) de datos paramétricos n-dimensionales. Un elemento de diferenciación poblacional incluye la transformación geométrica y permitir que los datos paramétricos n-dimensionales se clasifiquen dentro de una de al menos dos poblaciones. Por ejemplo, un espermatozoide puede clasificarse dentro de una población de portadores del cromosoma X y de una población de portadores del cromosoma Y. Puede realizarse una transformación geométrica bidimensional de los datos de la citometría de flujo, de manera que las
 65 partículas, o incluso las células puedan separarse en distintos viales basándose en la propiedad adecuada. En el caso de los espermatozoides, un vial contendrá células que darían origen a machos y otro células que darían origen a hembras.

Una transformación incluye una operación de rotación e incluiría una matriz de puntos producto de distintas traslaciones y operaciones de escalado para discriminar las células que determinarían el sexo masculino de las que determinarían el sexo femenino, e incluso podría mantener la identificación del tipo celular correcto durante la deriva de la señal a lo largo del tiempo. Las transformaciones se combinarían en una sola matriz de transformación de manera que los cálculos puedan realizarse dentro del tiempo disponible para el procesamiento de la señal, como los de un procesador de señales digitales.

En las realizaciones, la presente invención incluye clasificación en tiempo real de datos paramétricos n-dimensionales de cada partícula individual en una de al menos dos poblaciones. Un elemento de clasificación en tiempo real incluye la clasificación de datos de la señal en una población, la toma de la decisión de separación y la separación de una partícula dentro del corto espacio de tiempo que necesita la partícula para atravesar el citómetro de flujo. En consecuencia, la presente invención permite, en las realizaciones, la separación de partículas individuales basada en una clasificación en tiempo real.

La presente invención permitiría, en las realizaciones, la distinción visual de al menos dos poblaciones de datos paramétricos n-dimensionales. Esto ayudaría al usuario a asegurarse de que la separación se esté llevando a cabo adecuadamente. También permitiría que el usuario contribuyese a la discriminación entre poblaciones. Las realizaciones incluirían la expresión gráfica de datos paramétricos n-dimensionales de cada partícula individual en relación a al menos dos poblaciones. Por ejemplo, convendría representar los datos paramétricos n-dimensionales en un sistema de coordenadas cartesianas. Una primera señal se representaría en un eje (14) y al menos una señal adicional se representaría en al menos un eje adicional (15), como se muestra en la Figura 3. En otras realizaciones incluso se obtendría un histograma (17) de los datos paramétricos n-dimensionales.

Determinadas partículas o células manifestarían señales que pueden mostrar las diferencias aumentadas mediante traslación o efectos de escalado. Por ejemplo, un espermatozoide con el cromosoma X no se discriminaría de otro con el cromosoma Y mediante una señal luminosa inalterada típica detectada por un citómetro de flujo. Aunque una señal digitalizada tuviera una resolución de 12 bits, un sistema electrónico de separación tendría una resolución de 8 bit, desechando posiblemente los 4 bits inferiores. La luz detectada procedente de células espermáticas con el cromosoma X y de células espermáticas con el cromosoma Y sería tan parecida que se necesitarían los 4 bits inferiores para poder discriminarlas. Igualmente, debido a su similitud, las células no se discriminarían eficazmente en el análisis de datos del histograma de los parámetros detectados, posiblemente porque los histogramas también tendrían una resolución degradada.

Las partículas o las células espermáticas ocuparían una zona pequeña del histograma (17). La variación en las señales detectadas procedentes de células o partículas, al igual que en el caso de las células espermáticas portadoras del cromosoma X respecto a las portadoras del cromosoma Y, sería pequeña; como lo sería la variación entre células o partículas del mismo tipo. El intervalo total de variación para ambos tipos de células o partículas puede abarcar menos de la mitad del intervalo total disponible. Por tanto, los bits inferiores de la resolución serían importantes para discriminar entre las células o partículas, y posiblemente los bits superiores no serían necesarios para identificar ambos tipos de células o partículas. Esta característica se aprovecharía trasladando una parte central del intervalo total de variación de la señal para ambos tipos de células o partículas a un origen de un sistema de coordenadas cartesianas, escalando los datos alrededor del origen para aumentar de forma eficaz la varianza entre los tipos y luego volviendo a trasladarlos a su situación original. Como resultado, los datos del histograma mostrarían suficiente variación para discriminar entre los dos tipos de células o partículas, mientras se preserva suficiente información como para separar ambos tipos de la perturbación instrumental, las células muertas o destruidas, otras partículas extrañas, etc. Esto se aplica en especial a la discriminación por sexo de las células espermáticas.

Los datos paramétricos n-dimensionales pueden combinarse para alcanzar matemáticamente resultados numéricos representativos de una alteración. Un cálculo de alteración incluiría cualquier tipo de manipulación de los datos. La invención incluye una alteración rotacional aplicada a los datos paramétricos n-dimensionales. Las realizaciones incluirían una alteración de la traslación. En otras realizaciones, los datos paramétricos n-dimensionales se combinarían para alcanzar matemáticamente resultados numéricos representativos de una operación de escalado. Por supuesto, se utilizarían otros tipos de alteraciones y cálculos, y cualquier alteración se aplicaría como una operación única o posiblemente en combinación con otras. La clasificación de una partícula se basa en resultados numéricos representativos de una alteración.

En las realizaciones, cuyo concepto se explica en la Figura 7, puede detectarse una señal (45) asociada a una partícula por al menos un detector (45) que enviaría los datos de la señal a un procesador (47) de señales. En un procesador de señales, los datos de la señal se transforman en datos paramétricos n-dimensionales, a los cuales se aplica al menos una alteración (48) (incluyendo una alteración rotacional y una operación de traslación o una operación de escalado o ambas). Basándose en esta alteración, los datos paramétricos n-dimensionales se clasifican dentro de una de al menos dos poblaciones aplicando una clasificación (49) en tiempo real. La decisión (50) de diferenciar una partícula se toma conforme a una clasificación en tiempo real de los datos paramétricos n-dimensionales, cuyas direcciones se enviarían a un citómetro (51) de flujo para cargar y clasificar las partículas.

Determinadas partículas o células manifestarían señales que pueden mostrar las diferencias aumentadas mediante una alteración rotacional de los datos. La invención implica rotar los datos para incrementar la separación de datos

entre las células espermáticas con el cromosoma X y las células espermáticas con el cromosoma Y. Se detectarían dos fuentes de luz para cada célula. El intervalo de intensidad lumínica de una fuente de células espermáticas con el cromosoma Y solaparía el mismo intervalo de fuente lumínica de las células espermáticas con el cromosoma X. El uso de un factor de escalado, tal como se ha descrito anteriormente, aumentaría la separación de la distribución media del intervalo de la señal, pero no eliminaría completamente el solapamiento.

Para eliminar el solapamiento en este ejemplo concreto, la invención tendría en cuenta la forma de la distribución de la señal en un análisis bidimensional en donde las señales de posiblemente dos fuentes de luz se correlacionarán en un eje de coordenadas cartesianas bidimensional. En una representación gráfica, cada una de las poblaciones de estos tipos de células tendría una población (18) de forma elíptica con ángulos de inclinación no ortogonales similares de un eje mayor y una longitud similar de un eje menor. La diferencia en la intersección en Y del eje mayor de la elipse entre un tipo de célula y otro sería superior a la longitud del eje menor. Como los ejes mayores serían casi paralelos, convendría orientar las poblaciones con forma elíptica en una posición ortogonal con respecto a al menos un eje. La rotación alrededor de un punto medio entre los dos ejes mayores orientaría cada elipse en un ángulo ortogonal con respecto al eje Y, posiblemente eliminando de forma eficaz el solapamiento en el eje Y.

Señales tales como la intensidad de la luz podrían variar a lo largo del tiempo, con lo que se descartaría la configuración de regiones fijas en las cuales basar las decisiones de separación. Durante una separación larga, las poblaciones pueden derivar debido a cambios físicos en los detectores, a la absorción o degradación del colorante e incluso a otras condiciones no controlables. Por tanto, las regiones de separación deberían monitorizarse y ajustarse durante la separación. Esto puede resultar pesado y arduo y aumentar las posibilidades de error.

Una realización de la presente invención mantendría a la población en su situación original utilizando una operación de escalado en la matriz de transformación. Un posible factor de escalado sería la relación entre un valor medio inicial del intervalo de la señal y la media actual; así se escalaría de forma eficaz la señal en sentido ascendente o descendente en proporción a la magnitud de la deriva respecto al valor inicial.

Como se ha señalado anteriormente, se utiliza un citómetro de flujo para generar una corriente en la cual se inyectan las células u otras partículas. Se establecería un punto de detección que haría que una fuente de luz láser incidiese en las células, probablemente haciendo que el colorante absorbido por el genoma emita fluorescencia. En una aplicación, los espermatozoides se orientarían por la hidrodinámica del dispositivo de inyección; y el nivel de fluorescencia probablemente sería proporcional a la cantidad de masa genómica. Por tanto, podría detectarse una diferencia entre los espermatozoides portadores del cromosoma X y los portadores del cromosoma Y. La fluorescencia la detectarían sensores situados en posición frontal respecto al punto de detección y posiblemente también en un ángulo de 90 grados respecto a dicho punto, tal como se explica en las Figuras 1 y 2. Un sistema de sensores es capaz de pasar un impulso de luz a un dispositivo eléctrico que convertiría un nivel de pulso en números binarios adecuados para su manipulación por un procesador de señales digitales (DSP).

Un procesador de señales, tal como un DSP, contendría algoritmos altamente optimizados capaces de realizar una transformación especializada de al menos dos valores de señales. Esta transformación haría que una población de señales resultante adoptase una forma, que sería similar a la que trazaría la separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X y los portadores del cromosoma Y. La claridad en el trazado permitiría seleccionar cada población con mayor exactitud que con cualquier otro sistema de separación.

La selección de las poblaciones que van a separarse puede hacerse mediante un sistema electrónico similar al que controla un desprendimiento de las gotículas en un citómetro de flujo estándar. Puede haber un retraso entre la detección de fluorescencia y la caída de una partícula en una última gota desprendida (36). Este tiempo sería conocido. Así, un sistema electrónico puede aplicar una carga eléctrica a la gota que contiene la partícula de interés. Los electrodos de alto voltaje situados por debajo de las gotas desprendidas harían que estas se desplazasen y cayesen dentro de un vial de recogida. De esta forma puede recolectarse un alto nivel de partículas seleccionadas, probablemente como células espermáticas puras, tal como se explica en la Figura 1.

Un procesador de señales digitales controlaría la posición de las poblaciones. Los citómetros de flujo tendrían cierta variabilidad en la exactitud de enfoque de un haz láser, lo que puede hacer que cambie la intensidad de la fluorescencia de cada célula. Un DSP actuaría como un dispositivo sensor para monitorizar el cambio de intensidad de la luz e incluso aplicaría una escala correctora para garantizar que las poblaciones que se encuentren en la bivariable de fluorescencia continúen en la misma posición. Esto garantizaría la separación de los espermatozoides correctos. El proceso de transformación, zoom y quizás incluso control se integraría en la transformación geométrica. La transformación múltiple y el zoom podrían incorporarse quizás con búsquedas en tablas logarítmicas, no lineales, o incluso con transformaciones discretas únicas de parte de los datos. La transformación aportaría únicamente la exactitud requerida para permitir una separación de partículas de alta pureza.

Un método para obtener datos separados espacialmente sería el uso de algoritmos de compensación que los expertos en la materia podrían apreciar. La rotación de los datos (dispersión frontal respecto a dispersión lateral) sería un mecanismo más preciso para hacerlo. Además de la rotación, se ha descubierto que podría ser necesario

realizar el rastreo y zoom de los datos. Estas combinaciones pueden ser significativas; por ejemplo, la selección del sexo no puede lograrse de forma óptima con ningún otro método, de ahí la importancia de esta invención.

Al rotar un histograma bivalente en el cual estén presentes dos poblaciones que se solapan en una dimensión, se crea una mejor separación espacial en la dimensión solapada. De acuerdo con la invención, los datos rotados se utilizan como un parámetro en las decisiones de separación y posiblemente en otros histogramas. Si los datos se han rotado adecuadamente, un histograma univalente del parámetro de interés puede contener espacios vacíos en las poblaciones. En las realizaciones, se utilizaría una función de rotación para configurar las poblaciones X e Y en una bivalente horizontal.

Dado que las poblaciones de interés estarían normalmente muy juntas, convendría, ya sea solo o en combinación con otros aspectos, ampliar una región mediante zoom para exagerar la distinción entre las poblaciones. Este sería otro mecanismo para separar las poblaciones. Además, los largos procesos típicos de la separación de espermatozoides o similares harían que los datos se desplazasen a lo largo del tiempo. Estos desplazamientos se fijarían estableciendo una región de rastreo y utilizando esta región en un parámetro calculado de nuevo. En las realizaciones, se implementaría un algoritmo de configuración automática de la región. En otras realizaciones, se pueden configurar regiones de acuerdo con el nivel de pureza deseado.

Para rotar y separar datos, una rotación se podría hacer utilizando un equipo informático capaz de acceder a los datos en un soporte de adquisición y de modificar un evento antes de adoptar una decisión de separación. Más que diseñar un nuevo equipo informático, convendría implementarlo en un DSP, posiblemente utilizando un algoritmo de rotación. Esto incluiría la capacidad de compensación de datos al rotar. Además de la rotación, un usuario puede especificar la región sometida al zoom de ampliación.

En las realizaciones, la presente invención aportaría la especificación de un punto central de la rotación. Esto permitiría un control más preciso de la rotación para alcanzar la separación máxima.

Un ejemplo incluiría facilitar una función de alteración del espacio n-dimensional que tuviera al menos:

un primer valor de alteración unidimensional, un segundo valor de alteración unidimensional y un tercer valor de alteración unidimensional;

un primer valor de alteración bidimensional, un segundo valor de alteración bidimensional y un tercer valor de alteración bidimensional, etc.

Esto podría ser representativo de una matriz, que un experto en la materia puede apreciar y los ejemplos expuestos en la presente memoria pueden ayudar a entender.

Las funciones de alteración del espacio n-dimensional se combinarían con un vector que tuviera puntos de datos para alterar los datos paramétricos n-dimensionales. En un ejemplo, una combinación de una función y puntos de datos incluiría, entre otros: el cálculo de los tiempos de un primer valor de alteración unidimensional, un punto de datos unidimensional sumado a los tiempos de un segundo valor de alteración unidimensional, un punto de datos bidimensional sumado a los tiempos de un tercer valor de alteración unidimensional, un punto de datos tridimensional para crear así un primer punto de datos alterados dimensional; y el cálculo de los tiempos de un primer valor de alteración bidimensional, un punto de datos unidimensional sumado a los tiempos de un segundo valor rotacional bidimensional, un punto de datos bidimensional sumado a los tiempos de un tercer valor de alteración bidimensional, un punto de datos tridimensional para crear así un segundo punto de datos alterados dimensional.

En otros ejemplos, una función de alteración del espacio n-dimensional incluiría un primer valor de alteración tridimensional, un segundo valor de alteración tridimensional y un tercer valor de alteración tridimensional. Además, una combinación de datos incluiría el cálculo de los tiempos de un primer valor de alteración tridimensional, un punto de datos unidimensional sumado a los tiempos de un segundo valor rotacional tridimensional, un punto de datos bidimensional sumado a los tiempos de un tercer valor de alteración tridimensional un punto de datos tridimensional para así crear un tercer punto de datos alterados dimensional.

Pueden utilizarse muchos tipos distintos de valores de manipulación de datos como un valor alternativo. La alteración rotacional incluye valores de alteración basados en un ángulo de rotación que permita puntos de datos alterados para aumentar la discriminación de al menos dos poblaciones de datos n-dimensionales. En otras realizaciones, la alteración escalada incluiría valores de alteración basados en un elemento de zoom y rastreo que permita puntos de datos alterados para aumentar la discriminación de al menos dos poblaciones de datos n-dimensionales. En otras realizaciones, una alteración de traslación incluiría valores de alteración que trasladarían los datos de parámetros n-dimensionales, con respecto a un punto central de rotación.

Los siguientes son ejemplos de matrices que se utilizarían para la rotación alrededor de un punto central dado e incluso zoom o rastreo en una región, etc.

Trasladar datos:

$$T(C_x, C_y) = \begin{pmatrix} 1 & 0 & C_x \\ 0 & 1 & C_y \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

5 Rotar los datos:

$$R\theta = \begin{pmatrix} \cos\theta & \sin\theta & 0 \\ -\sin\theta & \cos\theta & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

10 Escalar los datos (zoom y rastreo):

$$S(D_x, D_y) = \begin{pmatrix} D_x & 0 & 0 \\ 0 & D_y & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Esto puede combinarse con las variables:

15 Res = Resolución/2

Z = Cantidad de zoom

RC = Centro de rotación

20

Tr = Constante de rastreo

ZC = Centro de rastreo

25 Θ = Ángulo de rotación

en una sola transformación realizada por el producto de todas o alguna de las operaciones lineales siguientes:

30 - $T(\text{Res}_x, \text{Res}_y)$

- $S(Z_x, Z_y)$

- $T(-ZC_x, -ZC_y)$

35 - $S(\text{Tr}_x, \text{Tr}_y)$

- $T(\text{RC}_x, \text{RC}_y)$

- $R\theta$

40

- $T(-\text{RC}_x, -\text{RC}_y)$

La ecuación $T(-\text{RC}_x, -\text{RC}_y)$ trasladaría un evento a un origen y después lo contrario para trasladarlo de nuevo a un sistema de coordenadas apropiado. Esto se aplicaría a todos los datos en modo de lista en el primer cuadrante.

45

Cuando se aplica el zoom a los datos, estos pueden centrarse en el histograma. Esta sería la razón por la cual los datos podrían trasladarse a la mitad ($1/2$) de la resolución, en vez de volver al punto central de la región sometida a zoom.

50 Otros ejemplos de alteraciones de transformación se basarían en operaciones tales como rotación en el eje X, rotación en el eje Y, rotación en el eje Z, traslación, escalado, la perspectiva, orden superior y similares. Algunos ejemplos incluyen los siguientes algoritmos 3D:

Rotación en el eje X:

$$R_x(\theta) = \begin{vmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos(\theta) & -\sin(\theta) & 0 \\ 0 & \sin(\theta) & \cos(\theta) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix}$$

5 Rotación en el eje Y:

$$R_y(\theta) = \begin{vmatrix} \cos(\theta) & 0 & \sin(\theta) & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ -\sin(\theta) & 0 & \cos(\theta) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix}$$

10 Rotación en el eje Z:

$$R_z(\theta) = \begin{vmatrix} \cos(\theta) & -\sin(\theta) & 0 & 0 \\ \sin(\theta) & \cos(\theta) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix}$$

Traslación:

$$T(T_x, T_y, T_z) = \begin{vmatrix} 1 & 0 & 0 & T_x \\ 0 & 1 & 0 & T_y \\ 0 & 0 & 1 & T_z \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix}$$

Escalado:

$$S(S_x, S_y, S_z) = \begin{vmatrix} S_x & 0 & 0 & 0 \\ 0 & S_y & 0 & 0 \\ 0 & 0 & S_z & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix}$$

Los ejemplos expuestos en la presente memoria no son los únicos posibles.

Los programas resolverían la ecuación particular utilizada y descargarían el resultado en el DSP. El código del DSP realizaría una simple multiplicación de matrices utilizando las matrices desarrolladas por los programas informáticos. Además, el programa informático crearía parámetros de zoom de manera que la media de las señales sometidas a zoom permanecería inalterada. La media permanecería en la misma posición dentro de una región rastreada. El software permitiría al usuario designar límites de regiones por los que podría regirse una función de zoom. El software enviaría al un DSP un centro de un zoom, el valor de zoom e incluso la ganancia de rastreo.

En las realizaciones, la aplicación del zoom en una región cuadrada de una división de poblaciones (como las poblaciones X e Y) mostraría un histograma bivalente de fluorescencia directa frontal a fluorescencia lateral. Una región sometida a zoom podría tener una forma cuadrada o también no cuadrada con un tamaño máximo que sería igual al tamaño de la bivalente. En las realizaciones, convendría usar una asignación de ganancia de 1 y una compensación de 0 en ambos parámetros. La región sometida a zoom podría establecerse como una fracción porcentual del intervalo bivalente en unidades lineales. Como los expertos en la materia reconocerán, un valor de 1/16 ofrecería una ventaja digital. En las realizaciones puede alterarse la ganancia de software (distinto de la ganancia de ampliación). Dado que el DSP sería un procesador de punto fijo, podría utilizarse un código de ensamblaje altamente optimizado para definir la matemática de punto flotante.

Para conseguir unos cálculos de datos eficaces en el corto periodo de separación de la clasificación en tiempo real, las realizaciones de la presente invención incluirían el procesamiento simultáneo de dos o más cálculos de alteraciones. Esto incluiría el procesamiento simultáneo de los datos paramétricos n-dimensionales para alcanzar matemáticamente resultados numéricos tanto de alteración rotacional como de alteración de escalado. Otras realizaciones incluirían el procesamiento simultáneo de los datos paramétricos n-dimensionales para alcanzar matemáticamente resultados numéricos de una alteración rotacional, de una alteración de escalado y posiblemente de una alteración de traslación. Por supuesto, también podrían procesarse otras alteraciones de forma simultánea o posiblemente de forma secuencial.

La Figura 3 es una imagen de los datos antes de la rotación. La Figura 4 muestra una imagen de los datos después del escalado; la Figura 5 muestra una imagen de los datos después de la rotación y la Figura 6 muestra

una imagen de los datos después del escalado y la rotación. También es frecuente observar estas ilustraciones de los datos de separación de los espermatozoides. Aunque la rotación permite al usuario obtener datos separados espacialmente, puede distorsionar los valores relativos de intensidad y, en las realizaciones, no se utilizaría por otros motivos que ganar espacio entre poblaciones distintas. Sería posible eliminar los valores en el eje de los datos rotados, a fin de garantizar que el usuario disponga de una forma visual de reconocimiento.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método de citometría de flujo que comprende los pasos de:
- 5 establecer un flujo (1) de líquido;
- introducir partículas en dicho flujo de líquido;
- 10 detectar una primera señal (45) relacionada con las partículas individuales en dicho flujo de líquido;
- detectar al menos una señal adicional (45) relacionada con dichas partículas individuales;
- 15 transformar dicha primera señal y dicha al menos una señal adicional relacionada con dichas partículas individuales en datos paramétricos n-dimensionales, donde «n» es igual al número de señales, en donde al menos dos poblaciones de dichas partículas individuales se solaparían en una de dichas n dimensiones;
- 20 alterar matemáticamente los datos paramétricos n-dimensionales mediante al menos la rotación (48) de los datos paramétricos n-dimensionales para crear una mejor separación espacial en la dimensión solapada;
- clasificar en tiempo real (49) dichos datos paramétricos n-dimensionales de cada una de dichas partículas individuales en una de dichas al menos dos poblaciones (8) utilizando dichos datos paramétricos n-dimensionales rotados, y
- 25 separar dichas partículas individuales basándose en dicha clasificación en tiempo real.
2. Un método de citometría de flujo según la reivindicación 1, y que comprende además los pasos de:
- 30 alterar matemáticamente dichos datos paramétricos n-dimensionales mediante al menos el escalado (48) de dichos datos paramétricos n-dimensionales, y
- clasificar en tiempo real dichos datos paramétricos n-dimensionales de cada una de dichas partículas individuales en una de dichas al menos dos poblaciones (8) basándose en al menos dichos datos paramétricos alterados mediante escalado.
- 35 3. Un método de citometría de flujo según la reivindicación 2, y que comprende además el paso de procesamiento simultáneo de dichos datos paramétricos n-dimensionales para alterar los datos tanto mediante escalado como rotación.
- 40 4. Un método de citometría de flujo según la reivindicación 1 o 2, y que comprende además los pasos de:
- alterar matemáticamente los datos paramétricos n-dimensionales mediante al menos la traslación (48) de los datos paramétricos n-dimensionales, y
- 45 clasificar en tiempo real dichos datos paramétricos n-dimensionales de cada una de dichas partículas individuales en una de dichas al menos dos poblaciones (8) basándose al menos en dichos datos paramétricos n-dimensionales trasladados.
- 50 5. Un método de citometría de flujo según la reivindicación 4, cuando depende de la reivindicación 2, y que comprende además el paso de procesamiento simultáneo de dichos datos paramétricos n-dimensionales para alcanzar matemáticamente resultados numéricos de las ambas dicha alteración rotacional, dicha alteración de escalado y dicha alteración de traslación.
6. Un método de citometría de flujo según la reivindicación 1, que comprende además la diferenciación visual de dichas al menos dos poblaciones (8) de dichos datos paramétricos n-dimensionales.
- 55 7. Un método de citometría de flujo según la reivindicación 6, en donde dicho paso de diferenciación visual de dichas al menos dos poblaciones (8) de dichos datos paramétricos n-dimensionales comprende la expresión gráfica de dichos datos paramétricos n-dimensionales para cada una de dichas partículas individuales en relación a dichas al menos dos poblaciones.
- 60 8. Un método de citometría de flujo según la reivindicación 6, en donde dicho paso de diferenciación visual de dichas al menos dos poblaciones de dichos datos paramétricos n-dimensionales comprende la representación gráfica de dichos datos paramétricos n-dimensionales en un sistema de coordenadas cartesianas.
- 65

- 5
9. Un método de citometría de flujo según la reivindicación 8, en donde dicho paso de representación gráfica de dichos datos paramétricos n-dimensionales en un sistema de coordenadas cartesianas comprende el paso de representar dicha primera señal (45) en un eje (14) y representar dicha al menos una señal adicional (45) en al menos un eje adicional (15).
- 10
10. Un método de citometría de flujo según la reivindicación 6, en donde dicho paso de diferenciación visual de dichas al menos dos poblaciones de dichos datos paramétricos n-dimensionales comprende los pasos de:
- 10
- facilitar gráficamente las poblaciones (18) con forma elíptica de cada una de dichas al menos dos poblaciones (8) con ángulos de inclinación no ortogonales con respecto a al menos un eje, y
- orientar dichas poblaciones con forma elíptica en un ángulo ortogonal con respecto a al menos un eje.
- 15
11. Un método de citometría de flujo según la reivindicación 1, en donde dichas partículas incluyen espermatozoides, y en donde dichas al menos dos poblaciones (8) incluyen una población de espermatozoides portadores del cromosoma X y una población de espermatozoides portadores del cromosoma Y.
- 20
12. Un método de citometría de flujo según la reivindicación 1, en donde dicha primera señal (45) y dicha al menos una señal adicional (45) incluyen la fluorescencia emitida por un elemento emisor de luz acoplado a dichas partículas individuales tras pasar a través de un haz láser (34).
13. Un citómetro de flujo configurado para aplicar el método conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

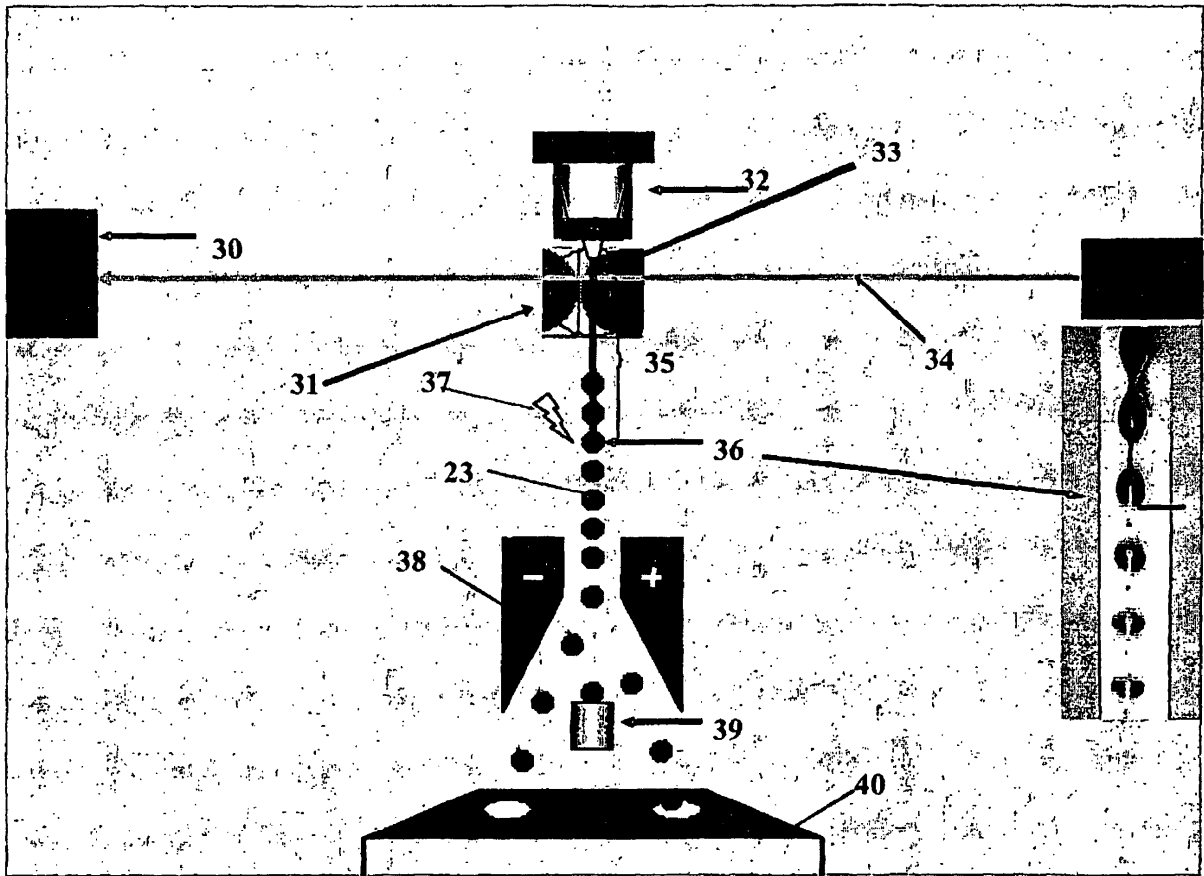


FIG. 1

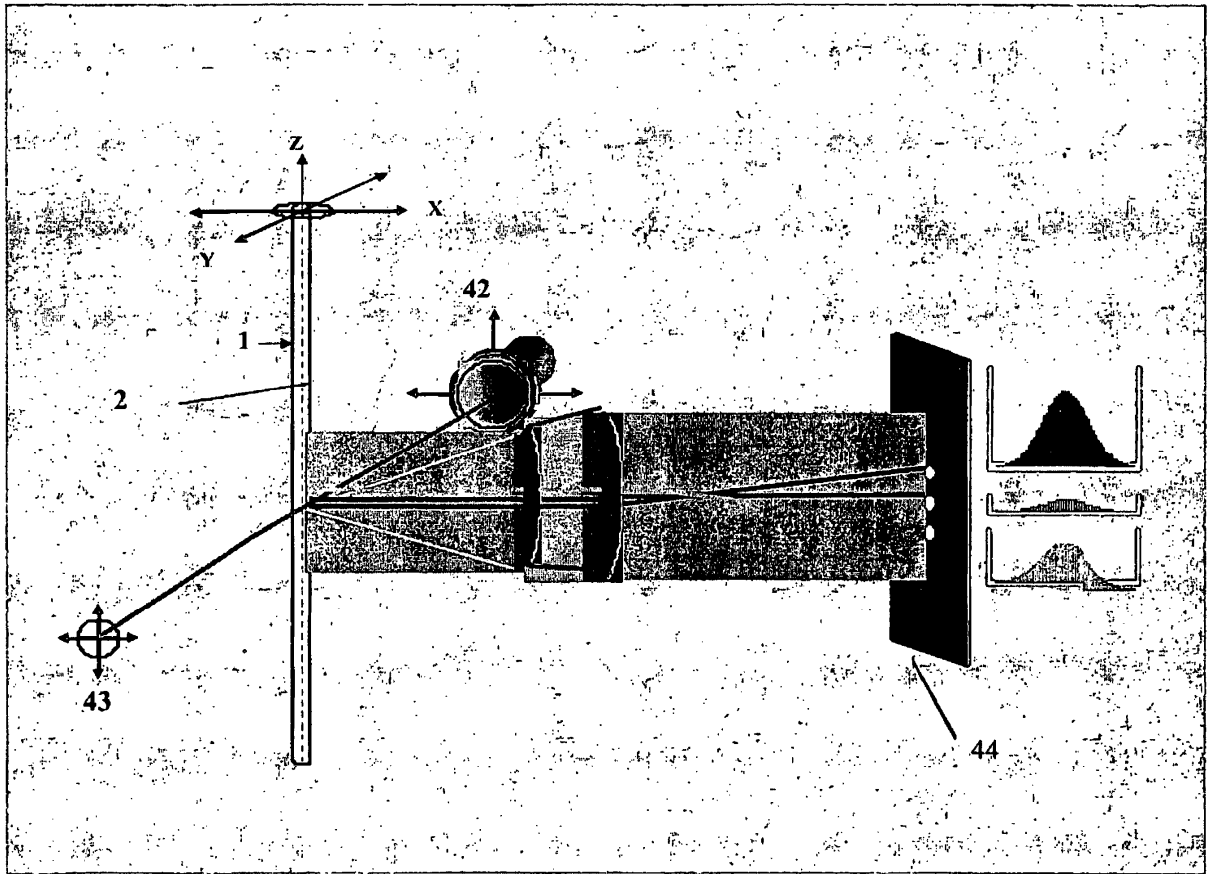


FIG. 2

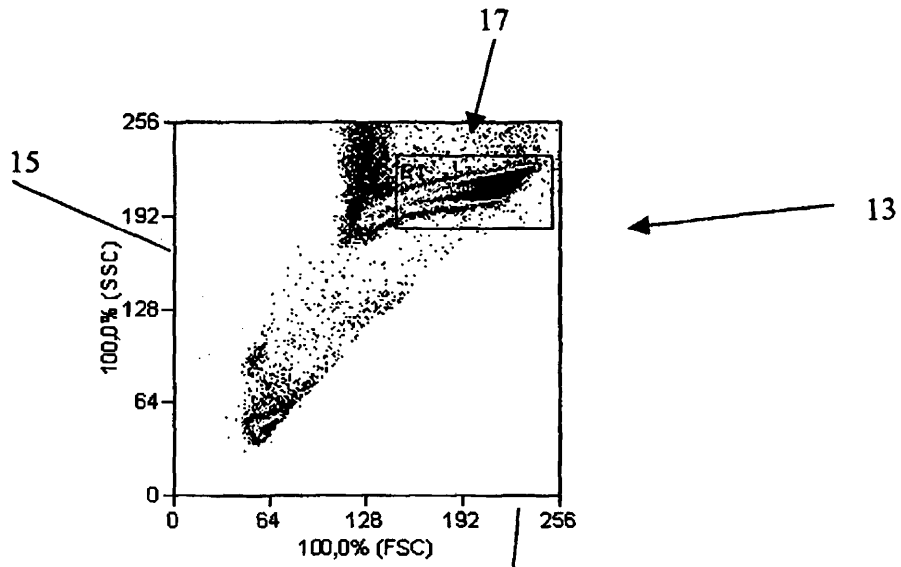


FIG. 3

14

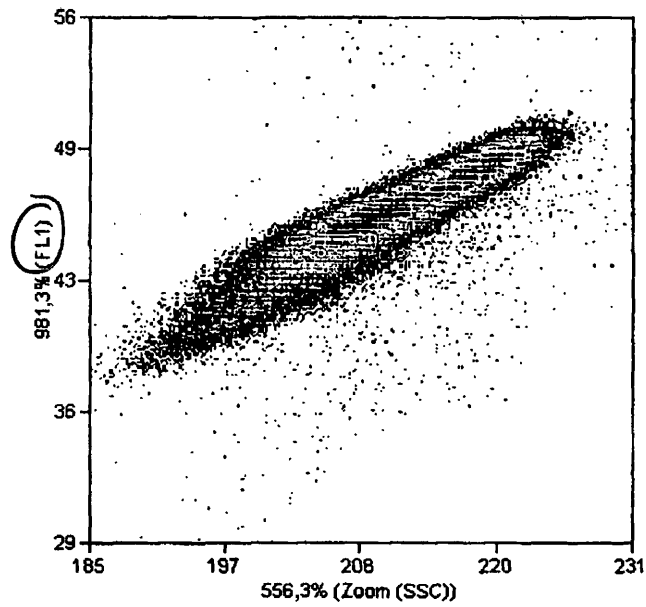


FIG. 4

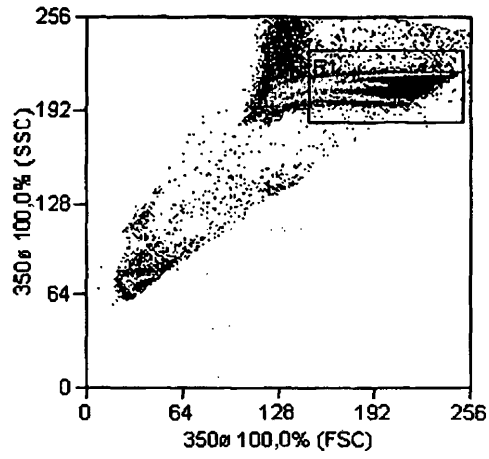


FIG. 5

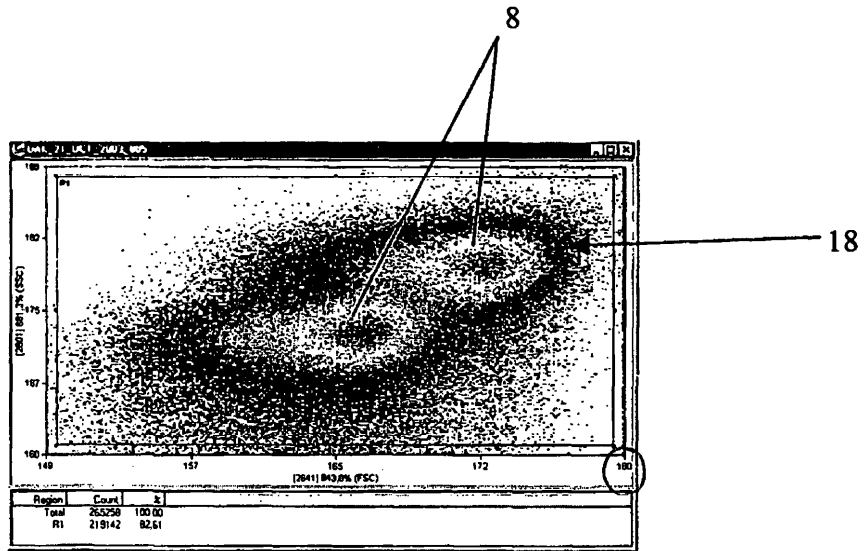


FIG. 6

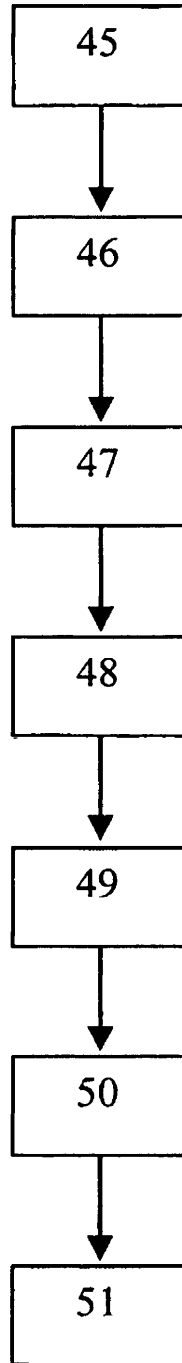


FIG. 7