

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 527**

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 15153894 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016** **EP 2884258**

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

30 Prioridad:

27.07.2004 US 591957 P

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

31.03.2017

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:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 607 527 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 implementada por ordenador

Campo técnico

5 La presente invención incluye en realizaciones métodos y aparatos para la discriminación en tiempo real de las partículas a la vez que se separan mediante citometría de flujo. Más concretamente, las realizaciones de la invención pueden incluir la aplicación de diversas operaciones matemáticas para manipular datos en tiempo real que den como resultado una discriminación mejorada entre poblaciones de partículas.

Antecedentes de la invención

10 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, el objetivo
15 puede ser obtener espermatozoides viables y móviles del semen o posiblemente incluso 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.

20 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
25 podría utilizarse como una discriminación para clasificación 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
30 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. Una 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. Un contorno puede ser necesario para establecer una región que pueda separarse de forma exclusiva.

35 En WO0032542A se describe un sistema para separar micropartículas en una muestra en donde 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 una citometría de flujo. En US-6662117B se describe un analizador de partículas y un método para clasificar partículas
40 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 línea de clasificación parabólica.

Descripción de la invención

45 En consecuencia, es deseable mejorar la discriminación entre partículas durante la citometría de flujo.

Según un primer aspecto, se proporciona un programa informático para realizar los pasos siguientes en un sistema de citometría de flujo:

(a) transformar una primera señal y al menos una señal adicional relacionada con partículas individuales en una corriente fluida en un sistema de citometría de flujo en datos paramétricos n-dimensionales, donde “n” es
50 igual al número de señales, en donde al menos dos poblaciones de dichas partículas individuales se solapan en una de dichas n dimensiones;

(b) alterar matemáticamente los datos paramétricos n-dimensionales mediante al menos la rotación de los datos paramétricos n-dimensionales para crear una mejor separación espacial en la dimensión en que están solapados; y

(c) clasificar en tiempo real dichos datos paramétricos n-dimensionales de cada una de dichas partículas individuales en una de dichas al menos dos poblaciones utilizando dichos datos paramétricos n-dimensionales rotados;

para facilitar la separación de dichas partículas individuales basándose en dicha clasificación en tiempo real.

5 Dicho programa informático podría comprender además los pasos de:

alterar matemáticamente dichos datos paramétricos n-dimensionales mediante al menos el escalado de dichos datos paramétricos n-dimensionales; y

10 clasificar en tiempo real dichos datos paramétricos n-dimensionales de cada una de dichas partículas individuales en una de dichas al menos dos poblaciones basándose en al menos dichos datos paramétricos alterados mediante escalado.

El programa informático podría además comprender el paso de procesar simultáneamente dichos datos paramétricos n-dimensionales para alterar los datos tanto mediante escalado como rotación.

El programa informático podría además comprender los pasos de:

15 alterar matemáticamente los datos paramétricos n-dimensionales mediante al menos la traslación de los 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 trasladados.

20 El programa informático podría comprender además el paso de procesar simultáneamente dichos datos paramétricos n-dimensionales para alcanzar matemáticamente resultados numéricos tanto de dicha alteración rotacional, dicha alteración de escalado, como de dicha alteración de traslación.

El programa informático podría comprender además la diferenciación visual de dichas al menos dos poblaciones de dichos datos paramétricos n-dimensionales.

25 Dicho paso de diferenciación visual de dichas al menos dos poblaciones de dichos datos paramétricos n-dimensionales podría comprender la expresión gráfica de dichos datos paramétricos n-dimensionales para cada una de dichas partículas individuales en relación con dichas al menos dos poblaciones.

Dicho paso de diferenciación visual de dichas al menos dos poblaciones de dichos datos paramétricos n-dimensionales podría comprender la representación gráfica de dichos datos paramétricos n-dimensionales en un sistema de coordenadas cartesianas.

30 Dicho paso de representación gráfica de dichos datos paramétricos n-dimensionales en un sistema de coordenadas cartesianas podría comprender el paso de representar dicha primera señal en un eje y representar dicha al menos una señal adicional en al menos un eje adicional.

El paso de diferenciación visual de dichas al menos dos poblaciones de dichos datos paramétricos n-dimensionales podría comprender los pasos de:

35 representar gráficamente las poblaciones con forma elíptica de cada una de dichas al menos dos poblaciones 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.

40 Dichas partículas podrían comprender espermatozoides. Dichas al menos dos poblaciones podrían comprender una población de espermatozoides portadores del cromosoma X y una población de espermatozoides portadores del cromosoma Y. Dicha primera señal y dicha al menos una señal adicional podrían comprender la fluorescencia emitida por un elemento emisor de luz acoplado a dichas partículas individuales tras pasar a través de un haz láser.

Según un segundo aspecto, se proporciona un citómetro de flujo que comprende el programa informático según el primer aspecto.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 es una muestra de 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.

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

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

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

10 Las realizaciones de la invención pueden incluir diversos métodos, aparatos, sistemas, y similares para distinguir partículas durante la citometría de flujo. En un citómetro de flujo se puede crear una corriente fluida (1) 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 pueden acoplar a un elemento emisor de luz; por ejemplo, una realización puede incluir un colorante Hoechst. Cada partícula individual puede emitir una primera señal y posiblemente al menos una señal adicional. Se puede colocar 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 puede captar una primera señal relacionada con una partícula individual y posiblemente al menos un detector de señales adicional puede detectar como mínimo una señal adicional relacionada con una partícula individual. Esto puede incluir cualquier tipo de señal que pudiera estar relacionada, quizá incluso estrechamente relacionada, con una partícula individual, tal como fluorescencia, radiancia o similares, pero sin limitarse a ellos.

20 Como ejemplo, las Figuras 1 y 2 representan una visión general del proceso de separación mediante citometría de flujo. Una boquilla (32) puede permitir que las partículas (2) arrastradas en una corriente fluida (1) se muevan a través de un haz láser (34) en un punto de interrogación (33). Se puede colocar un detector (42) de señales, tal como un detector (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 sería deseable colocar lentes (43) para enfocar el láser primario. En las realizaciones, las señales pueden incluir 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 pueden pasar a través de lentes y posiblemente de una banda perforada (44) para ayudar a recopilar los datos. Se puede conectar un detector de señales a un sistema, como se comenta más adelante, en el cual se pueden procesar y analizar los datos indicativos de las señales para determinar la decisión de separación. Una decisión de separación podría tomarse con ayuda de ordenadores, 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 puede aplicar un pulso de carga (37) a una gotícula (23) que contiene una partícula. Las gotículas pueden pasar a través de placas deflectoras (38) cargadas para separar las partículas en un receptáculo de clasificación (40) deseado con recipientes separados. Las realizaciones pueden incluir un tubo (39) colector de desechos.

25 Para distinguir las partículas se pueden analizar los datos de la señal. Las realizaciones pueden incluir señales de conversión (p. ej., una primera señal y al menos una señal adicional) relacionadas con cada partícula individual en datos paramétricos n-dimensionales. Esto se puede hacer con un procesador de señales sensible a las señales. Un procesador de señales puede permitir una conversión de una primera señal y al menos una señal adicional en datos paramétricos n-dimensionales. Los datos paramétricos n-dimensionales pueden incluir datos unidimensionales o posiblemente incluso 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 y similar, y pueden incluso trasladarse a una gráfica en un sistema de coordenadas cartesianas.

30 45 Las señales, posiblemente incluso los datos paramétricos n-dimensionales, se pueden representaren una gráfica (13). Como las diferencias entre partículas pueden variar ligeramente, las señales asociadas con las partículas también pueden variar ligeramente. Estas ligeras diferencias podrían ser tan pequeñas que, al representarlas gráficamente, los datos paramétricos n-dimensionales correspondientes a las señales se pueden trasladar a puntos situados muy próximos unos de otros. Pueden estar tan cerca que dificultarían la clasificación de los puntos de datos en una población. Las tecnologías convencionales pueden haber ignorado estos puntos situados tan cerca unos de otros y pueden haber rechazado esa partícula porque no podría distinguirse. En las realizaciones sería deseable reconfigurar los datos para mejorar la separación entre los puntos de datos.

50 55 Las realizaciones incluyen la distinción de al menos dos poblaciones (8) de datos paramétricos n-dimensionales. Un elemento de diferenciación poblacional incluye una transformación geométrica y permite 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 partículas, o incluso las células puedan separarse en distintos viales basándose en una

propiedad adecuada. En el caso de los espermatozoides, un vial contiene células que darían origen a machos y otro contiene células que darían origen a hembras. Una transformación incluye una operación de rotación y puede incluir una matriz de puntos producto de distintas traslaciones y operaciones de escalado para discriminar las células que determinarán el sexo masculino de las que determinarán el sexo femenino, e incluso puede mantener la identificación del tipo celular correcto durante la deriva de la señal a lo largo del tiempo. Las transformaciones se pueden combinar 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 la 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 proporciona, en las realizaciones, la separación de partículas individuales basada en una clasificación en tiempo real.

La presente invención puede proporcionar, en las realizaciones, la distinción visual de al menos dos poblaciones de datos paramétricos n-dimensionales. Esto puede ayudar al usuario a asegurarse de que la separación se esté llevando a cabo adecuadamente. También puede permitir que el usuario contribuyese a la discriminación entre poblaciones. Las realizaciones pueden incluir la expresión gráfica de datos paramétricos n-dimensionales de cada partícula individual en relación con al menos dos poblaciones. Por ejemplo, sería deseable 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 puede representar en al menos un eje adicional (15), como se muestra en la Figura 3. En otras realizaciones incluso se puede proporcionar un histograma (17) de los datos paramétricos n-dimensionales.

Determinadas partículas o células pueden manifestar señales que pueden mostrar las diferencias aumentadas mediante traslación o efectos de escalado. Por ejemplo, un espermatozoide que determina el sexo masculino no se discriminaría de otro que determina el sexo femenino mediante una señal luminosa inalterada típica detectada por un citómetro de flujo. Aunque una señal digitalizada puede tener una resolución de 12 bits, un sistema electrónico de separación puede tener una resolución de 8 bit, desechando posiblemente los 4 bits inferiores. Una luz detectada procedente de células espermáticas que determinan el sexo masculino y femenino puede ser tan parecida que se pueden necesitar los 4 bits inferiores para poder discriminarlas. Igualmente, debido a su similitud, las células no se pueden discriminar 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 pueden ocupar 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 que determinarán el sexo masculino respecto a las células espermáticas que determinarán el sexo femenino, puede ser pequeña; como lo puede ser 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 incluso los bits superiores pueden no ser 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 pueden mostrar suficiente variación para discriminar entre los dos tipos de células o partículas, mientras se preserva suficiente información como para identificar ambos tipos de la perturbación instrumental, las células muertas o destruidas, otras partículas extrañas, y similares. 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 puede incluir cualquier tipo de manipulación de los datos. La invención incluye una alteración rotacional aplicada a los datos paramétricos n-dimensionales. Las realizaciones pueden incluir una alteración de traslación. En otras realizaciones, los datos paramétricos n-dimensionales pueden combinarse para alcanzar matemáticamente resultados numéricos representativos de una operación de escalado. Por supuesto, podría utilizarse otro tipo de alteraciones y cálculos y se podría aplicar cualquier alteración como una sola operación o quizá incluso en combinación con otras. La clasificación de una partícula se basa en resultados numéricos representativos de una alteración.

En las realizaciones, como se puede entender conceptualmente en la Figura 7, puede detectarse una señal (45) asociada a una partícula por al menos un detector (46) 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), incluida 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 proporcionando 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 pueden enviar a un citómetro (51) de flujo para cargar y clasificar las partículas.

5 Determinadas partículas o células pueden manifestar señales que pueden mostrar 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 que determinan el sexo masculino y las células espermáticas que determinan el sexo femenino. Se pueden detectar dos fuentes de luz para cada célula. El intervalo de intensidad lumínica de una fuente de células que determinarán el sexo masculino puede solapar el mismo intervalo de fuente lumínica de las células que determinarán el sexo femenino. El uso de un factor de escalado, tal como se ha descrito anteriormente, puede aumentar la separación de la distribución media del intervalo de la señal, pero no puede eliminar completamente el solapamiento.

10 Para eliminar el solapamiento en este ejemplo concreto, la invención puede considerar una forma de la distribución de la señal en un análisis bidimensional en donde las señales de posiblemente dos fuentes de luz se pueden correlacionar en un sistema de coordenadas cartesiano bidimensional. En una representación gráfica, cada una de las poblaciones de estos tipos de células puede tener una población (18) de forma elíptica con ángulos de inclinación no ortogonales similares de un eje mayor y puede tener incluso 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 puede ser superior a la longitud del eje menor. Como los ejes mayores pueden ser casi paralelos, puede ser deseable orientar las poblaciones con forma elíptica en una posición ortogonal con respecto a al menos un eje. Una rotación alrededor de un punto medio entre los dos ejes mayores puede orientar cada elipse en un ángulo ortogonal con respecto al eje Y, posiblemente eliminando de forma eficaz el solapamiento en el eje Y.

15 Señales tales como la intensidad de la luz se pueden variar a lo largo del tiempo, con lo que se puede descartar la configuración de regiones fijas en las cuales se pueden 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 pueden necesitar monitorizarse y ajustarse durante la separación. Esto puede resultar pesado y arduo y aumentar las posibilidades de error.

20 Una realización de la presente invención mantendría una población en su situación original utilizando una operación de escalado en la matriz de transformación. Un factor de escalado posible podría ser una relación de un valor medio inicial del intervalo de la señal con respecto a la media actual; que puede escalar eficazmente la señal arriba o abajo proporcionalmente a la cantidad de deriva de la media inicial.

25 Como se ha señalado anteriormente, se utiliza un citómetro de flujo para generar una corriente en la cual se pueden inyectar las células u otras partículas. Se puede establecer un punto de detección que puede causar que una fuente de luz láser incidiese en las células, probablemente haciendo que el colorante que lleva el genoma emita fluorescencia. En una aplicación, los espermatozoides pueden estar orientados por la hidrodinámica del dispositivo de inyección; y quizá el nivel de fluorescencia podría ser proporcional a la cantidad de masa genómica. Por tanto, se puede detectar una diferencia entre los espermatozoides portadores del cromosoma X y los portadores del cromosoma Y. La fluorescencia la pueden detectar sensores situados en posición frontal respecto al punto de detección y posiblemente también en un ángulo, tal como 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 puede convertir un nivel de pulso en números binarios adecuados para su manipulación por un procesador de señales digitales (DSP).

30 Un procesador de señales, tal como un procesador de señales digitales, puede contener algoritmos altamente optimizados capaces de realizar una transformación especializada de al menos dos valores de señales. Esta transformación puede hacer 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 puede permitir seleccionar cada población con mayor exactitud que con cualquier otro sistema de separación.

35 La selección de que población se va a separar 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 puede ser 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.

40 Un procesador de señales digitales puede controlar la posición de las poblaciones. Los citómetros de flujo pueden tener 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 puede actuar como un dispositivo sensor para monitorizar el cambio de intensidad de la luz e incluso puede aplicar una escala correctora para garantizar que las poblaciones que se encuentren en la bivariente de fluorescencia continúen en la misma posición. Esto puede garantizar la separación de

los espermatozoides correctos. El proceso de transformación, zoom y quizás incluso control se puede integrar en una transformación geométrica. La transformación múltiple y el zoom se podrían incorporar quizá incluso con transformaciones no lineales; logarítmicas, consulta de tablas, o incluso transformaciones de porciones de datos discretamente exclusivas. La transformación puede aportar únicamente la exactitud requerida para proporcionar una separación de partículas de alta pureza.

Un método para obtener datos separados espacialmente puede ser 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) puede ser 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 univariante del parámetro de interés puede contener espacios vacíos en las poblaciones. En las realizaciones, se puede utilizar una función de rotación para configurar las poblaciones X e Y en una bivalente horizontal. Dado que las poblaciones de interés pueden estar normalmente muy juntas, sería deseable, ya sea solo o en combinación con otros aspectos, ampliar una región mediante zoom para exagerar la distinción entre las poblaciones. Este puede ser otro mecanismo para separar las poblaciones. Además, los largos procesos típicos de la separación de espermatozoides o similares pueden hacer que los datos se desplazasen a lo largo del tiempo. Estos desplazamientos se pueden fijar estableciendo una región de rastreo y utilizando esta región en un parámetro calculado de nuevo. En las realizaciones, se puede implementar un algoritmo de configuración automática de la región. En otras realizaciones, se pueden configurar regiones de acuerdo con un 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, sería deseable implementarlo en un DSP, posiblemente utilizando un algoritmo de rotación. Esto puede incluir 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 puede aportar la especificación de un punto central de la rotación. Esto puede permitir un control más preciso de la rotación para alcanzar la separación máxima.

Los ejemplos incluirían 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;

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

Esto puede ser representativo de una matriz, como un experto en la materia puede apreciar y se puede entender de los ejemplos expuestos a continuación.

Las funciones de alteración del espacio n-dimensional se pueden combinar con un vector que tuviera puntos de datos para alterar los datos paramétricos n-dimensionales. En una combinación de ejemplo de una función y puntos de datos se podría incluir, aunque no de forma limitativa: 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 así crear 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 y un punto de datos bidimensional sumado a los tiempos de un tercer valor de alteración bidimensional, un punto de datos tridimensional para así crear un segundo punto de datos alterados dimensional.

En otros ejemplos, una función de alteración del espacio n-dimensional puede incluir un primer valor de alteración tridimensional, un segundo valor de alteración tridimensional y un tercer valor de alteración tridimensional. Además, una combinación de datos puede incluir 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 de alteración. La alteración rotacional incluye valores de alteración basados en un ángulo de rotación que permita a puntos de datos alterados aumentar la discriminación de al menos dos poblaciones de datos n-dimensionales. En otras realizaciones, una alteración escalada puede incluir valores de alteración basados en un elemento de zoom y rastreo que permita a

puntos de datos alterados aumentar la discriminación de al menos dos poblaciones de datos n-dimensionales. En otras realizaciones, una alteración de traslación puede incluir valores de alteración que pueden trasladar los datos de parámetros n-dimensionales, con respecto a un punto central de rotación.

- 5 Los siguientes son ejemplos de matrices que se pueden utilizar para hacer la rotación alrededor de un punto central dado e incluso zoom o rastreo en una región, y similares.

Trasladar datos:

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

Rotar los datos:

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

- 10 Escalar los datos (zoom y rastreo):

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

Estos puede combinarse con las variables:

Res = Resolución/2

z = Cantidad de zoom

- 15 RC = Centro de rotación

Tr = Constante de rastreo

ZC = Centro de rastreo

Θ = Ángulo de rotación

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

- 20 - $T(\text{Res}_x, \text{Res}_y)$
 - $S(Z_x, Z_y)$
 - $T(-ZC_x, -ZC_y)$
 - $S(\text{Tr}_x, \text{Tr}_y)$
 - $T(\text{RC}_x, \text{RC}_y)$
- 25 - $R\theta$
 - $T(-\text{RC}_x, -\text{RC}_y)$

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

- 30 Cuando se aplica el zoom a los datos, estos pueden centrarse en el histograma. Esta puede ser la razón por la cual los datos podrían trasladarse a la mitad ($\frac{1}{2}$) de la resolución, en vez de volver al punto central de la región sometida a zoom.

Otros ejemplos de alteraciones de transformación se pueden basar 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:

5

$$R_X(\theta) = \begin{vmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos(\theta) & -\text{sen}(\theta) & 0 \\ 0 & \text{sen}(\theta) & \cos(\theta) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix}$$

Rotación en el eje Y

$$R_Y(\theta) = \begin{vmatrix} \cos(\theta) & 0 & \text{sen}(\theta) & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ -\text{sen}(\theta) & 0 & \cos(\theta) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix}$$

Rotación en el eje Z

10

$$R_Z(\theta) = \begin{vmatrix} \cos(\theta) & -\text{sen}(\theta) & 0 & 0 \\ \text{sen}(\theta) & \cos(\theta) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix}$$

Traslación:

$$T(T_X, T_Y, T_Z) = \begin{vmatrix} 1 & 0 & 0 & T_X \\ 0 & 1 & 0 & T_Y \\ 0 & 0 & 1 & T_Z \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix}$$

$$S(S_X, S_Y, S_Z) = \begin{vmatrix} S_X & 0 & 0 & 0 \\ 0 & S_Y & 0 & 0 \\ 0 & 0 & S_Z & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix}$$

Se entiende que los ejemplos expuestos no son limitantes.

- 15 Los programas pueden resolver la ecuación particular utilizada y pueden descargar el resultado en el DSP. El código del DSP puede realizar una simple multiplicación de matrices utilizando las matrices proporcionadas por los programas informáticos. Además, un programa informático puede crear parámetros de zoom de manera que la media de las señales sometidas a zoom pueden permanecer inalteradas. La media puede permanecer en la misma posición dentro de una región rastreada. El software permitiría al usuario designar límites de regiones por los que
- 20 podría regirse una función de zoom. El software puede enviar a un DSP un centro de un zoom, el valor de zoom e incluso la ganancia de rastreo.

- 25 En las realizaciones, la aplicación del zoom en una región cuadrada en una división de poblaciones (como las poblaciones X e Y) se puede mostrar en un histograma bivalente de fluorescencia directa frontal en comparación con uno de fluorescencia lateral. Una región sometida a zoom puede tener una forma cuadrada o incluso no cuadrada con un tamaño máximo que puede ser igual a un tamaño de la bivalente. En las realizaciones, puede ser deseable usar una asignación de ganancia de 1 y una compensación de 0 en ambos parámetros. Una región sometida a zoom se puede establecer como una fracción porcentual del intervalo bivalente en unidades lineales. Como los expertos en la materia reconocerán, un valor de 1/16 puede ofrecer una ventaja digital. En las realizaciones puede alterarse la ganancia de software (distinto de la ganancia de zoom). Dado que el DSP puede ser

un procesador de punto fijo, podría utilizarse un código de ensamblaje altamente optimizado para definir la matemática de punto flotante.

5 Para conseguir unos cálculos de datos eficaces en el corto periodo de separación de la clasificación en tiempo real, en 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 tanto de una alteración rotacional, de una alteración de escalado, como posiblemente de una alteración de traslación. Por supuesto, también se pueden procesar otras alteraciones de forma simultánea o posiblemente de forma secuencial.

10 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 común ver estas muestras de datos de los datos de separación de espermatozoides. Aunque la rotación permite al usuario obtener datos separados espacialmente, puede distorsionar los valores relativos de intensidad y, en realizaciones, no se puede utilizar por otros motivos que ganar espacio entre poblaciones distintas. Puede ser 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.

REIVINDICACIONES

1. Un programa informático para realizar los pasos en un sistema de citometría de flujo de:
 - 5 (a) transformar una primera señal y al menos una señal adicional relacionada con partículas individuales en una corriente fluida en un sistema de citometría de flujo en datos paramétricos n-dimensionales, donde “n” es igual al número de señales, en donde al menos dos poblaciones de dichas partículas individuales se solapan en una de dichas n dimensiones;
 - (b) 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 en que están solapados; y
 - 10 (c) clasificar (49) en tiempo real 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;

para facilitar la separación de dichas partículas individuales basándose en dicha clasificación en tiempo real.
- 15 2. Un programa informático según la reivindicación 1, que además comprende los pasos de:

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.
- 20 3. Un programa informático según la reivindicación 2, que además comprende el paso de procesar simultáneamente dichos datos paramétricos n-dimensionales para alterar los datos tanto mediante escalado como rotación.
4. Un programa informático según la reivindicación 1 o 2, que además comprende los pasos de:
 - 25 alterar matemáticamente los datos paramétricos n-dimensionales mediante al menos la traslación (48) de los 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 n-dimensionales trasladados.
- 30 5. Un programa informático según la reivindicación 4, cuando depende de la reivindicación 2, que además comprende el paso de procesar simultáneamente dichos datos paramétricos n-dimensionales para alcanzar matemáticamente resultados numéricos tanto de dicha alteración rotacional, dicha alteración de escalado, como de dicha alteración de traslación.
- 35 6. Un programa informático según la reivindicación 1, que además comprende diferenciar visualmente dichas al menos dos poblaciones (8) de dichos datos paramétricos n-dimensionales.
7. Un programa informático 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.
- 40 8. Un programa informático 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 n-paramétricos n-dimensionales en un sistema de coordenadas cartesianas.
9. Un programa informático 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).
- 45 10. Un programa informático 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:

representar 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
- 50

orientar dichas poblaciones con forma elíptica en un ángulo ortogonal con respecto a al menos un eje.

11. Un programa informático según la reivindicación 1, en donde dichas partículas comprenden espermatozoides; y en donde dichas al menos dos poblaciones (8) comprenden una población de espermatozoides portadores del cromosoma X y una población de espermatozoides portadores del cromosoma Y.
12. Un programa informático según la reivindicación 1, en donde dicha primera señal (45) y dicha al menos una señal (45) adicional comprende fluorescencia emitida desde un elemento emisor de luz acoplado a dichas partículas individuales tras pasar a través de un haz láser (34).
13. Un aparato citómetro de flujo que comprende el programa informático según cualquier reivindicación anterior.

FIG. 1

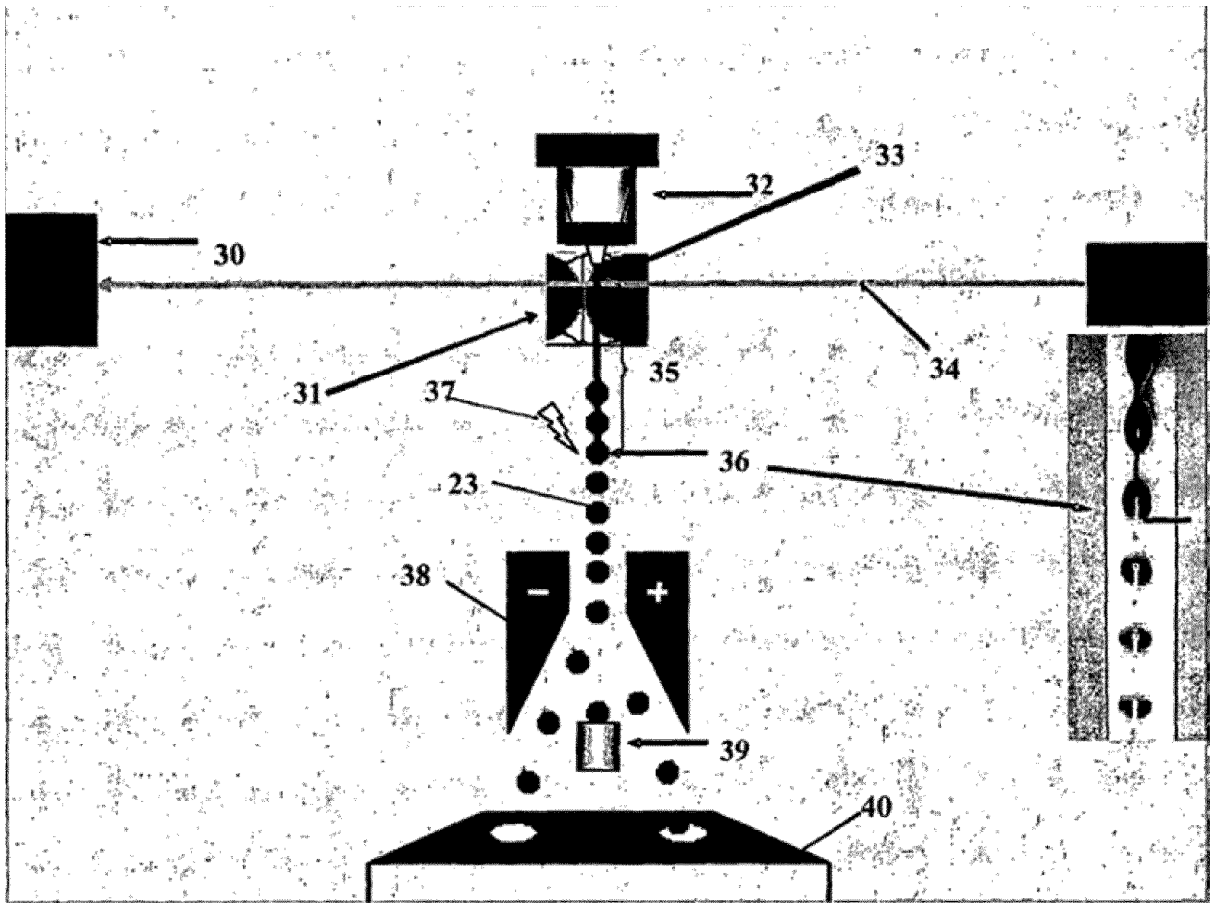


FIG. 2

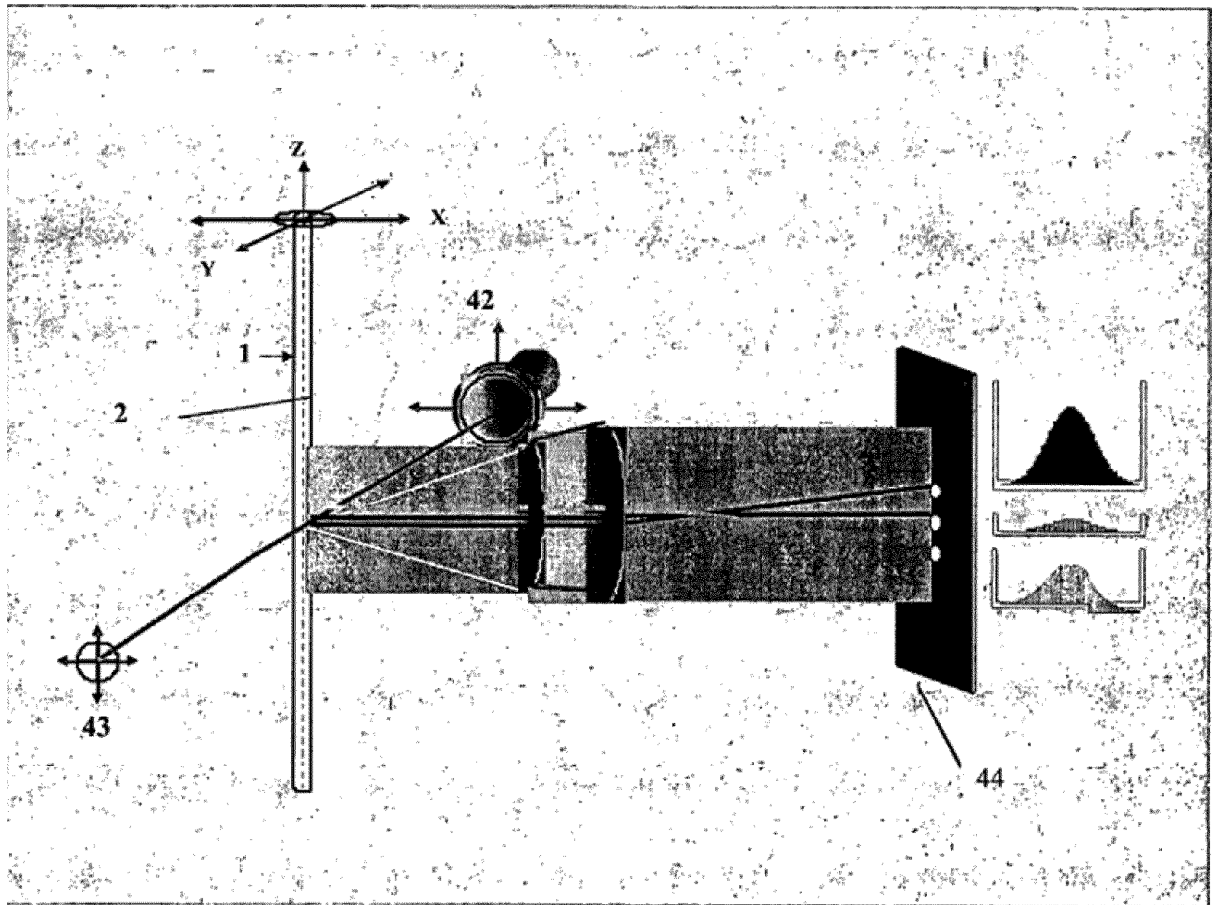


FIG. 3

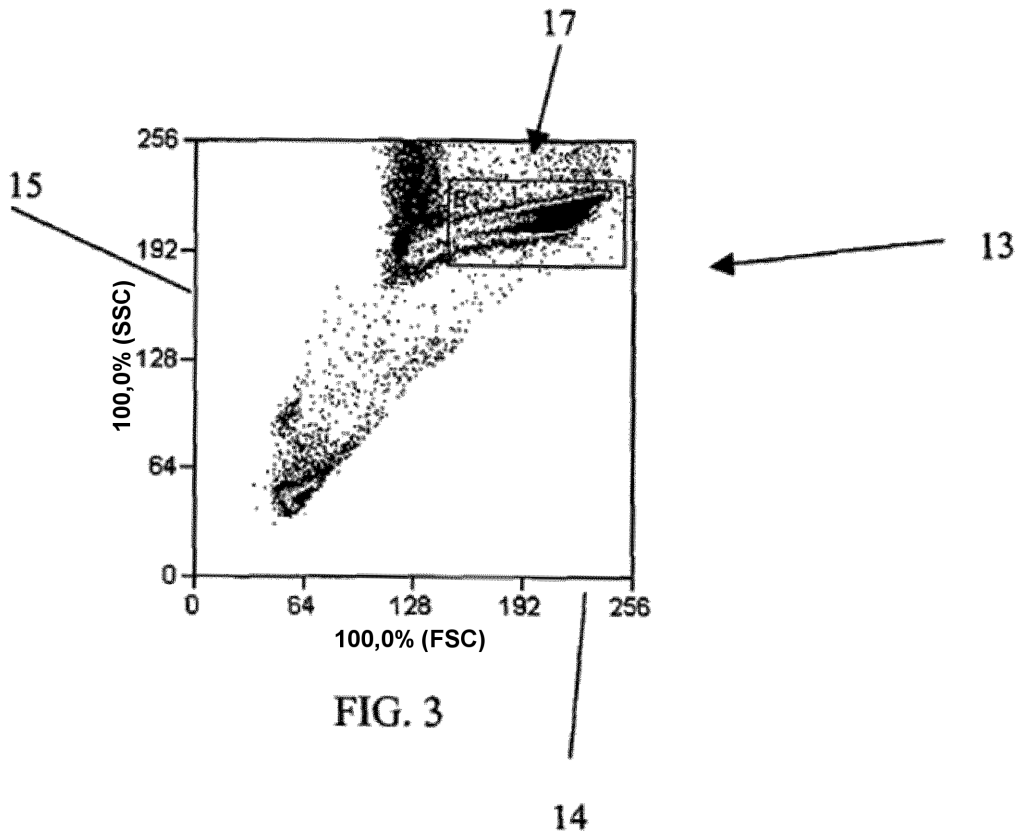


FIG. 3

FIG. 4

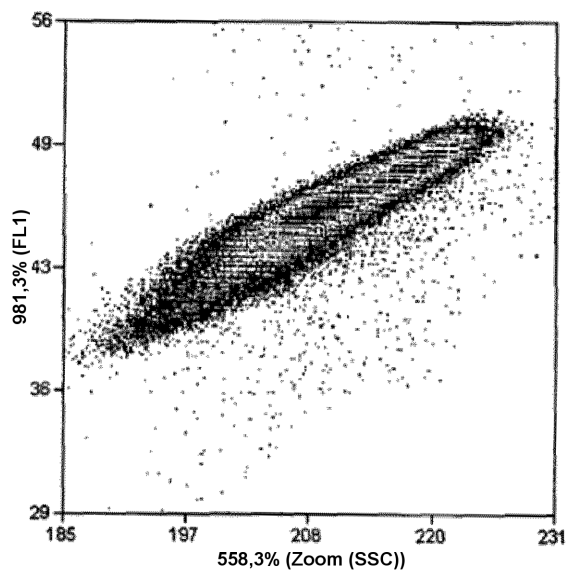


FIG. 5

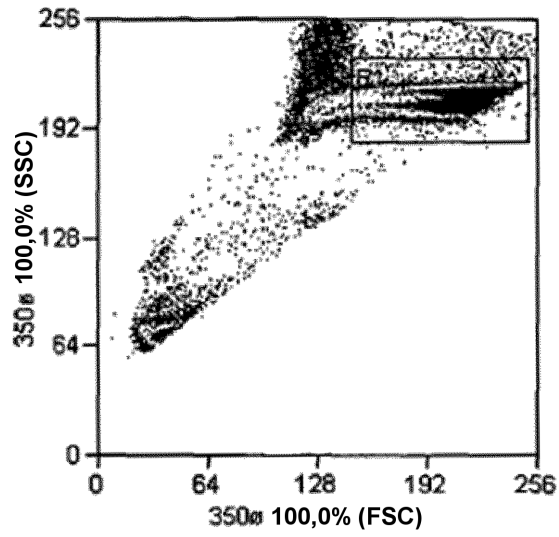


FIG. 6

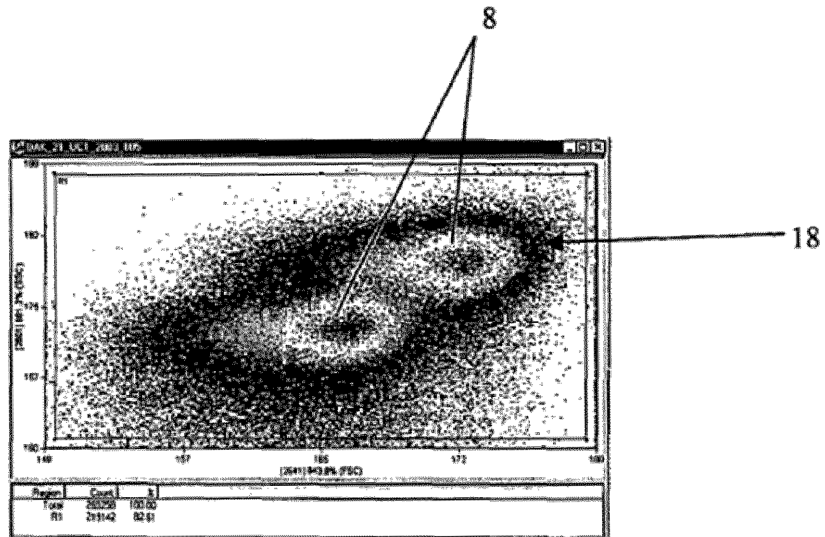


FIG. 7

