

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 843**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2009 PCT/US2009/059363**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010 WO10042401**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 09819687 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2350611**

54 Título: **Detección y gestión de coincidencia en el análisis de partículas**

30 Prioridad:

10.10.2008 US 249473

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

25.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BRITTON, TED, W.;
LU, JIULIU y
ROSE, JEFFREY, L.**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 717 843 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección y gestión de coincidencia en el análisis de partículas

5 **Antecedentes****Campo**

10 Esta invención se refiere en general al análisis de partículas usando un analizador de partículas, y más particularmente a la detección y la gestión, cuando se miden partículas solapantes sustancialmente al mismo tiempo, por ejemplo, coincidencia, en datos generados por un analizador de partículas.

Antecedentes

15 Se utilizan analizadores de partículas para analizar muestras biológicas e industriales para determinar el recuento y/o la distribución de uno o más tipos de partículas contenidas en las muestras. En la industria médica, con el fin de analizar o investigar fluidos corporales, pueden usarse analizadores de partículas, incluyendo analizadores de hematología y citómetros de flujo. Por ejemplo, los analizadores de hematología y los citómetros de flujo se usan para medir y diferenciar entre diferentes tipos de células sanguíneas mediante la captura y análisis de señales. Las
20 señales se producen usando sondas que interactúan con la muestra cuando las células sanguíneas pasan por una pequeña abertura o región de medición. En general, una muestra de sangre se diluye en un líquido antes de dirigirse a fluir a través de una celda de flujo que contiene la región de medición. Uno o más sensores o detectores están dispuestos para detectar diversas características de las células sanguíneas que pasan por la región de medición a medida que las células sanguíneas interactúan con la sonda.

25 Durante la medición, la muestra de sangre diluida se inyecta en la celda de flujo a una velocidad sustancialmente constante. Se obtiene una lectura de referencia cuando no hay ninguna célula sanguínea en la región de medición de la célula de flujo. Cuando está presente una célula sanguínea, las propiedades físicas de la región de medición se alteran. Por tanto, la señal difiere de la señal de referencia respectiva cuando una celda está en la región de
30 medición. La desviación de las lecturas del sensor aumenta gradualmente a medida que la célula sanguínea fluye hacia el punto medio de la región de medición y luego disminuye gradualmente a medida que la célula sanguínea fluye alejándose del punto medio.

35 Es una práctica común recoger y analizar una señal máxima (es decir, un pico) producida por la interacción de la célula sanguínea y uno o más parámetros de medición, por ejemplo, corriente continua (CC) que obedece al principio de Coulter, radiofrecuencia (RF), dispersión de luz (LS), pérdida de luz axial (ALL), ultrasonido, etc. En general, el pico de la señal es una función bien definida de la interacción entre un tipo de célula sanguínea y un parámetro de medición, es decir, el tipo de estímulo y sensor. Por ejemplo, el pico de una señal generada por una
40 medición de CC indica el volumen de la celda, y la celda puede clasificarse en función del volumen. Las células se cuentan y los tipos de células se identifican basándose en uno o más parámetros de medición.

Las aplicaciones basadas en la relación anterior se basan en las células sanguíneas que pasan por la región de medición al mismo tiempo. Si múltiples células sanguíneas pasan por la región de medición simultáneamente (es
45 decir, coincidencia), la desviación máxima entre la señal capturada y la señal de referencia ya no es una función bien definida de la interacción entre un tipo de célula sanguínea y los parámetros de medición. Además, en presencia de una gran coincidencia, los histogramas acumulados de las señales recibidas pueden distorsionarse y los resultados analíticos pueden verse comprometidos.

50 Los enfoques convencionales para abordar la coincidencia incluyen la aplicación de métodos estadísticos a los recuentos de datos de partículas e histogramas para compensar los errores de coincidencia esperados. Otro método para detectar la coincidencia se basa en el área y el pico de una señal generada cuando una partícula pasa por una región de medición. Sin embargo, los métodos estadísticos pueden no producir una eliminación de coincidencia precisa debido a errores de estimación inherentes. Además, los métodos que se basan en una razón de área con respecto a pico de una señal generada por una partícula pueden no ser lo suficientemente precisos para partículas
55 de diferentes tamaños y formas. Las medidas basadas en área con respecto a pico también pueden producir resultados inconsistentes cuando las partículas pasan por la región de medición en diversas orientaciones.

60 Por tanto, lo que se necesita son métodos y sistemas mejorados para identificar y compensar datos representativos de coincidencia en los datos del analizador de partículas.

El documento US 2006/0132771 se refiere a un método de detección de partículas para detectar el número de partículas portadas por una corriente de gas. El método implica usar un sensor de recepción de luz para medir, a intervalos de tiempo predeterminados, la intensidad de la luz dispersada generada cuando una luz emitida en una corriente de gas se dispersa por una partícula.

65 El documento US 4418313 se refiere a un dispositivo y un procedimiento para examinar el tamaño de partículas

5 suspendidas en un líquido. Se disponen electrodos en la región de una abertura de medición y se conectan a un conjunto de circuitos de evaluación. Los electrodos producen un impulso por partícula que pasa por la abertura de medición. Un discriminador adicional permite el paso de sólo los impulsos cuya duración es menor que la duración de un impulso procedente de una partícula individual que tiene una amplitud máxima determinada por un discriminador diferencial.

El documento US 4021117 se refiere a un método de recuento y análisis de impulsos representativos de las características de las partículas que pasan por un dispositivo detector.

10 El documento US 2007/143033 se refiere a la medición y el análisis de recuentos de partículas en instrumentos de citometría de flujo y hematología. Da a conocer un método de medición y análisis de recuentos de partículas en instrumentos de citometría de flujo y hematología, comprendiendo el método determinar si la razón de la altura máxima del pico con respecto a la altura en el punto central del pico se encuentra dentro de un intervalo esperado.

15 El documento US 3949198 se refiere a métodos y aparatos de recuento de partículas que proporcionan una corrección estadística para un tren detectado de impulsos de recuento derivados de partículas.

Sumario

20 Se presentan métodos y sistemas para eliminar sustancialmente datos representativos de eventos coincidentes de los datos del analizador de partículas. Según la presente invención, se proporciona un método de análisis de partículas en un analizador de partículas según la reivindicación 1.

25 En diversos ejemplos, el método es aplicable al análisis de una amplia variedad de partículas. Además, en diversos ejemplos, el método puede implementarse en analizadores de partículas, incluyendo analizadores de hematología y citómetros de flujo.

30 Según la presente invención, se proporciona un sistema para analizar partículas en un analizador de partículas según la reivindicación 8.

35 Características y ventajas adicionales de la presente invención, así como la estructura y el funcionamiento de diversas realizaciones de la misma, se describen en detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos. Se indica que la invención no se limita a las realizaciones específicas descritas en el presente documento. Tales realizaciones se presentan en el presente documento únicamente con fines ilustrativos. Serán evidentes realizaciones adicionales para las personas expertas en la(s) técnica(s) relevante(s) basándose en las enseñanzas contenidas en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos/figuras

40 Características y ventajas adicionales de la presente invención, así como la estructura y el funcionamiento de diversas realizaciones de la misma, se describen en detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos. Se indica que la invención no se limita a las realizaciones específicas descritas en el presente documento. Tales realizaciones se presentan en el presente documento únicamente con fines ilustrativos. Serán evidentes realizaciones adicionales para las personas expertas en la(s) técnica(s) relevante(s) basándose en las enseñanzas contenidas en el presente documento.

La figura 1A es un sistema según una realización de la presente invención.

50 La figura 1B ilustra una representación gráfica de una señal capturada cuando una partícula atraviesa una región de medición, según una realización de la presente invención.

La figura 1C ilustra una representación gráfica de una señal capturada cuando más de una partícula atraviesa una región de medición de manera sustancialmente simultánea, según una realización de la presente invención.

55 Las figuras 2A y 2B muestran el patrón de dispersión, respectivamente, sin y con identificación y gestión de coincidencia, según una realización de la presente invención.

60 La figura 3 ilustra un gráfico de barras que muestra una comparación de los resultados logrados por una realización de la presente invención.

Las figuras 4A y 4B ilustran diagramas de dispersión, respectivamente, sin y con identificación y gestión de coincidencia aplicados, según una realización de la presente invención.

65 La figura 5 es un diagrama de flujo que ilustra las etapas para analizar una muestra de partículas, según una realización de la presente invención.

La figura 6 es un diagrama de flujo que detalla el procesamiento implicado en la determinación de los parámetros de señal de la figura 5, en una realización de la presente invención.

5 La figura 7 ilustra una propiedad sustancialmente constante de una medición (T50) en señales no coincidentes, a medida que aumenta el tamaño de la partícula, según una realización de la presente invención.

La figura 8 es un diagrama de flujo que muestra las etapas para determinar las mediciones características de coincidencia, según una realización de la presente invención.

10 La figura 9, 10, 11 y 12 son gráficos que ilustran parámetros de partículas, según una realización de la presente invención.

Las figuras 13, 14, 15, 16 y 17 son diagramas de dispersión que ilustran diversos efectos de la identificación de coincidencia, según una realización de la presente invención.

15 La figura 18 muestra una vista detallada de un módulo de analizador y un sistema, según una realización de la presente invención.

20 Las características y ventajas de la presente invención se harán más evidentes a partir de la descripción detallada que se expone a continuación cuando se tomen conjuntamente con los dibujos. En los dibujos, los números de referencia iguales generalmente indican elementos idénticos, funcionalmente similares y/o estructuralmente similares. En general, el dibujo en el que aparece un elemento por primera vez se indica mediante el/los dígito(s) más a la izquierda en el número de referencia correspondiente.

25 Descripción detallada

La presente invención se refiere a la detección y la gestión de eventos coincidentes. Esta memoria descriptiva da a conocer una o más realizaciones que incorporan las características de esta invención. La(s) realización/realizaciones dada(s) a conocer simplemente ejemplifica(n) la invención. El alcance de la invención no se limita a la(s) realización/realizaciones dada(s) a conocer. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

35 La(s) realización/realizaciones descrita(s) y las referencias en la memoria descriptiva a "una realización", "una realización de ejemplo", etc., indican que la(s) realización/realizaciones descrita(s) puede(n) incluir un rasgo distintivo, estructura o característica particular, pero cada realización puede no incluir necesariamente el rasgo distintivo, la estructura o la característica particular. Además, tales expresiones no se refieren necesariamente a la misma realización. Además, cuando un rasgo distintivo, estructura o característica particular se describe en relación con una realización, se entiende que está dentro del conocimiento de un experto en la técnica efectuar dicho rasgo distintivo, estructura o característica en relación con otras realizaciones, se describa o no explícitamente.

40 Las realizaciones de la invención pueden implementarse en hardware, firmware, software o cualquier combinación de los mismos. Las realizaciones de la invención también pueden implementarse como instrucciones almacenadas en un medio legible por máquina, que pueden leerse y ejecutarse por uno o más procesadores. Un medio legible por máquina puede incluir cualquier mecanismo para almacenar o transmitir información en una forma legible por una máquina (por ejemplo, un dispositivo informático). Por ejemplo, un medio legible por máquina puede incluir memoria de solo lectura (ROM); memoria de acceso aleatorio (RAM); medios de almacenamiento en disco magnético; medios de almacenamiento óptico; dispositivos de memoria flash; señales eléctricas, ópticas, acústicas u otras formas de señales propagadas (por ejemplo, ondas portadoras, señales infrarrojas, señales digitales, etc.) y otras. Además, puede describirse en el presente documento que el firmware, el software, las rutinas y las instrucciones realizan determinadas acciones. Sin embargo, debe apreciarse que tales descripciones son meramente por motivos de conveniencia y que tales acciones resultan, de hecho, de dispositivos informáticos, procesadores, controladores u otros dispositivos que ejecutan el firmware, software, rutinas, instrucciones, etc.

55 Visión general

60 Tal como se comentó anteriormente, cuando se produce coincidencia, por ejemplo, cuando múltiples partículas están en una zona de medición al mismo tiempo, durante el análisis de partículas, pueden distorsionarse los datos que representan los recuentos y las distribuciones de partículas. Los métodos y sistemas según realizaciones dadas a conocer a continuación proporcionan datos más precisos del analizador de partículas al eliminar o tener en cuenta de otro modo los eventos de coincidencia.

65 Los entornos a modo de ejemplo en los que pueden ponerse en práctica realizaciones de esta invención incluyen citómetros de flujo y analizadores de hematología, tales como los sistemas FC 500™ y Gen S™ de Beckman Coulter, respectivamente. El sistema Gen-S™, por ejemplo, utiliza la tecnología propiedad de Coulter de volumen, conductividad y dispersión (VCS) y pérdida de luz axial (ALL) para estudiar mediante sonda células enfocadas hidrodinámicamente dentro de una celda de flujo. VCS usa múltiples fuentes de energía independientes que trabajan

en conjunto entre sí para estudiar mediante sonda las células: una fuente de potencia de corriente continua de baja frecuencia para medir el volumen, una fuente de potencia de alta frecuencia para medir la conductividad y fuentes de luz láser para medir la pérdida de luz axial y la dispersión.

5 La medición del volumen se realiza usando el principio de Coulter de la impedancia eléctrica para medir físicamente el volumen que desplaza toda la célula en un diluyente isotónico. Este método dimensiona con precisión todos los tipos de células independientemente de su orientación en la trayectoria de la luz. La corriente alterna en el intervalo de radiofrecuencia (RF) se utiliza para recoger información detallada a modo de ejemplo de un analizador de partículas, incluyendo la composición química y el volumen nuclear.

10 Los sensores o detectores de dispersión de luz láser y de ángulo múltiple proporcionan información acerca de la estructura interna, la granularidad y la morfología de superficie de una célula. Además, los instrumentos de VCS utilizan la medición de volumen con CC de alta precisión, para obtener otras mediciones que se ajustan para el tamaño de célula a partir de la conductividad y la dispersión. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.616.501 (concedida a Rodríguez *et. al*) contiene una descripción detallada a modo de ejemplo de un analizador de partículas y del uso de la tecnología de VCS. Sin embargo, debe indicarse que las enseñanzas comentadas en el presente documento no se limitan a dispositivos que utilizan la tecnología de VCS. Por ejemplo, las realizaciones de la invención también son aplicables al dispositivo Multisizer™ 3 Coulter Counter®, un analizador de partículas con numerosas aplicaciones además del análisis de muestras biológicas.

20 La figura 1A ilustra componentes de un analizador 100 de partículas, según una realización de la presente invención. La figura 1A es sólo para fines ilustrativos, y debe entenderse que los analizadores de partículas pueden incluir más o menos módulos, diferentes módulos y diseños diferentes a los que se muestran en la figura 1A. El analizador 100 de partículas incluye un analizador 122 y un detector 124 de partículas. El detector 124 de partículas incluye un dispensador 102 de muestras, un dispensador 104 de fluido envolvente, una cámara 106, una celda 108 de flujo, un dispositivo 110 de medición, generadores 112 de sonda, sensores 114, un procesador 118 de señales y una región 120 de medición.

30 En el ejemplo mostrado, el dispensador 102 de muestras incluye una muestra 103 de partículas preparada según las necesidades de un análisis o ensayo deseado. Por ejemplo, una muestra de sangre puede diluirse con un diluyente hasta un grado predeterminado de concentración celular. El tipo de diluyente y el grado de dilución difieren según la prueba que esté ejecutándose, por ejemplo, el análisis de glóbulos blancos (WBC) requiere menos dilución que el de glóbulos rojos (RBC) porque el número de WBC en una muestra es bajo en comparación con el de RBC. El dispensador 104 de fluido envolvente contiene un fluido 105 envolvente tal como, por ejemplo, solución salina. El fluido 105 envolvente hace que la muestra 103 de partículas diluida esté restringida cerca del eje de flujo dentro del fluido envolvente en la celda 108 de flujo. La muestra 103 de partículas diluida procedente del dispensador 102 de muestras de partículas y el fluido 105 envolvente del dispensador 104 de fluido envolvente se unen en la cámara 106 para formar una corriente de muestra de fluido enfocada para el análisis. Las velocidades de flujo combinadas de la muestra y los fluidos envolventes crean una velocidad de flujo constante predeterminada en la celda 108 de flujo. Por ejemplo, la celda 108 de flujo puede ser un tubo de un pequeño diámetro diseñado para pasen que a su través partículas 107 restringidas por el fluido 105 envolvente. Los tiempos de llegada de las partículas 107 individuales en la región 120 de medición se ven afectados por varios factores incluyendo los diámetros de las partículas de muestra, la velocidad de flujo de la muestra, la velocidad de flujo combinada de la muestra y el fluido envolvente, y la concentración de partículas en la muestra.

45 En este ejemplo, el dispositivo 110 de medición se coloca dentro del analizador 100 de partículas, de manera que pueden emplearse uno o más sensores para detectar partículas 107 que fluyen a través de la celda 108 de flujo. Por ejemplo, las sondas 112 y uno o más sensores 114 pueden colocarse dentro del dispositivo 110 de medición de manera sustancialmente transversal a la celda 108 de flujo. En diversos ejemplos, las sondas 112 y los sensores 114 emplean uno o más de los dispositivos de medición eléctricos u ópticos para detectar partículas 107 en la celda 108 de flujo, específicamente partículas que fluyen a través de una región 120 de medición. Por ejemplo, un conjunto de sondas 112 emparejadas y sensores 114 puede emplear un parámetro de medición de CC para medir el volumen de una partícula 107 que pasa por la región 120 de medición. Otro conjunto de sondas 112 emparejadas y sensores 114 puede emplear un parámetro de medición de RF para medir las características de conductividad de una partícula 107 que pasa por la región 120 de medición. Otro conjunto de sondas 112 y sensores 114 puede emplear un parámetro de medición de luz para medir las características de dispersión de luz y pérdida de luz de una partícula 107 que pasa por la región 120 de medición. Además, o alternativamente, en otras realizaciones de la presente invención, las sondas 112 y los sensores 114 pueden incluir un dispositivo de medición acústica donde, por ejemplo, se usa un parámetro de medición de ultrasonido para detectar diversas características de una partícula 107 cuando pasa por la región 120 de medición.

60 Además, en el ejemplo mostrado, los sensores 114 están acoplados a un dispositivo 118 de procesamiento, tal como un procesador de señales. Los sensores 114 convierten las mediciones eléctricas u ópticas detectadas en impulsos de señales eléctricas correspondientes que pueden procesarse en el procesador 118 de señales. Por ejemplo, para cada partícula 107 que pasa por la región 120 de medición, se recogen los impulsos de señales eléctricas correspondientes a una secuencia de mediciones, por ejemplo, en el procesador 118 de señales. A partir

de estos impulsos de señales eléctricas, se produce una señal completa que es ilustrativa de las mediciones capturadas para un parámetro de medición mientras una partícula fluye a través de la región de medición (véanse, por ejemplo, las figuras 1B y 1C). La duración del tiempo de la señal se basa desde el momento en que la partícula entra en la región de medición hasta cuando la partícula sale de la región de medición. En realizaciones de la presente invención, el procesador 118 de señales puede realizar un procesamiento adicional de cada señal para derivar uno o más parámetros que describen la partícula que se detectó.

En este ejemplo, la detección de una partícula 107 dentro de la región 120 de medición se conoce como evento. Además, se genera un evento, específicamente un evento coincidente, cuando más de una partícula 107 está en la región 120 de medición de manera sustancialmente simultánea, es decir, cuando se produce una coincidencia. Por tanto, el procesador 118 de señales analiza la señal derivada correspondiente a cada evento detectado. Las señales analizadas para los eventos detectados se transmiten luego al analizador 122. En un ejemplo, el analizador 122 puede ubicarse en un ordenador acoplado al detector 124 de partículas, tal como una implementación mostrada en la figura 18. Cabe señalar que el analizador 122 puede ser parte del analizador 100 de partículas que comprende el detector 124 de partículas, o puede colocarse a distancia del analizador 100 de partículas y conectarse a través de un medio de comunicación inalámbrico o alámbrico tal como, pero sin limitarse a, Ethernet o wifi.

En un ejemplo, la generación de señales y la detección de eventos se realizan por separado para cada parámetro de medición eléctrico u óptico activo. Por ejemplo, el analizador 122 puede recibir datos de eventos correspondientes a cada parámetro de medición que está activo. El analizador 122 puede entonces analizar los datos de eventos recibidos para determinar uno o más recuentos, subpoblaciones de partículas u otras características correspondientes a la partícula. En una realización de la presente invención, el analizador 122 puede provocar o controlar la visualización de un diagrama de dispersión de los eventos recibidos.

La figura 1B ilustra una representación gráfica de una señal 150 correspondiente a mediciones de señales capturadas que se producen durante el período de tiempo en que una partícula se desplaza desde una entrada hasta una salida de una región de medición, según una realización de la presente invención. Cuando la partícula entra en la región de medición, la partícula interacciona sólo mínimamente con un dispositivo de medición, produciendo una señal de baja intensidad. El valor de la señal aumenta gradualmente, alcanzando un pico 152 cuando la partícula pasa por el punto medio de la región de medición. Después de pasar por el punto medio, el valor de la señal disminuye gradualmente cuando la partícula sale de la región de medición. Pueden usarse diversas partes de la señal 150 para determinar las características de la partícula, por ejemplo, los puntos 154 y 156 de mitad de pico primero y segundo, el punto medio de las líneas H50 de mitad de pico y otros puntos. Un intervalo de tiempo T50 entre los puntos 154 y 156 de mitad de pico también es determinante de las características de la partícula.

Las partículas coincidentes, es decir, cuando más de una partícula está presente simultáneamente dentro de la región 120 de medición, generalmente producen distorsiones en la señal correspondiente. En algunos casos, la distorsión de la señal puede dar como resultado determinaciones erróneas con respecto a las características de las partículas. La frecuencia de coincidencia generalmente aumenta con la concentración de partículas en la muestra que está analizándose.

Idealmente, cada partícula 107 individual pasará independientemente por el punto medio de la región 120 de medición física a una velocidad constante, creando así una señal unimodal simétrica. En este caso, la medición del pico de la señal representa el máximo de la interacción de la partícula con el parámetro de medición correspondiente, y está relacionada matemáticamente con algunas propiedades de partícula correspondientes. Un caso específico es que la medición del pico de CC es directamente proporcional al volumen de partícula según el principio de Coulter. Sin embargo, cuando existe más de una partícula 107 de manera sustancialmente simultánea dentro de la región 120 de medición, es decir, hay coincidencia, se confunde la relación esperada de la medición del pico de señal con las características de la partícula. La razón es que la señal observada de partículas coincidentes es, en general, la superposición de las señales correspondientes a las partículas individuales.

En un ejemplo, si las partículas coincidentes atraviesan la región de medición de manera sustancialmente simultánea, las señales individuales pueden solaparse de tal manera que la señal resultante puede ser una señal unimodal simétrica cuyo pico es igual a la suma de los picos individuales.

En otro ejemplo, si dos partículas coincidentes pasan por la región de medición por separado, pasando una antes que la otra, pero estando ambas dentro de la región de medición simultáneamente, las señales resultantes pueden oscilar entre ser unimodales (coincidencia antes de la bifurcación) y ser bimodales (coincidencia después de la bifurcación), lo que produce una señal que tiene una forma de M.

La figura 1C ilustra una representación gráfica de una señal 160 capturada cuando más de una partícula atraviesa una región de medición de manera sustancialmente simultánea, según una realización de la presente invención. Comenzando en un momento 168 cuando la primera de las partículas coincidentes entra en la región 120 de medición, la señal 160 aumenta gradualmente en valor a medida que las partículas coincidentes se aproximan al punto medio de la región 120 de medición y disminuye gradualmente en valor cuando las partículas han pasado el punto medio hasta el momento 169 cuando salen de la región 120 de medición. Cuando cada partícula coincidente

se aproxima al punto medio de la región 120 de medición, puede observarse un pico respectivo (por ejemplo, 162A y 162B), que da forma de M a la señal 160. Si las partículas coincidieran perfectamente (es decir, se solaparan completamente entre sí), entonces la señal resultante tendría solo un pico con un valor mayor que un pico asociado con cualquiera de las partículas sola.

5 Tal como se observa en la figura 1C, las distorsiones de la forma de la señal pueden variar dependiendo del intervalo temporal entre las partículas coincidentes, lo que puede impedir mediciones precisas de las características de la señal individual. En general, cuando se produce coincidencia, el instrumento registra un número menor de partículas y, lo que es más importante, puede que la medición del pico ya no sea precisa. En consecuencia, las
10 partículas coincidentes aparecen como ruido en diagramas de dispersión e histogramas, por ejemplo, en diagramas de dispersión de un diferencial de 5 partes. Por tanto, en casos en que la concentración de partículas es alta y la coincidencia es prevalente, los diagramas de dispersión y los histogramas basados en los datos detectados, procesados y analizados pueden distorsionarse sustancialmente. La distorsión puede producir resultados erróneos de selección, precisión y marcado.

15 Las figuras 2A y 2B ilustran una mejora que puede producirse en la visualización de datos en un diagrama de dispersión con detección y gestión de coincidencia usando una realización de la presente invención. La figura 2A es el patrón de dispersión sin identificación y gestión de coincidencia. La figura 2B es el patrón de dispersión con identificación y gestión de coincidencia. En este ejemplo, los diagramas de dispersión corresponden a mediciones de
20 CC frente a LS de una muestra de WBC de alta concentración con un 99% de linfocitos.

Tal como se comentó anteriormente, los analizadores de hematología utilizan información de posición, por ejemplo, basándose en parámetros de medición de CC, RF, LS y ALL, para diferenciar los tipos de células sanguíneas (por ejemplo, partículas). Puede utilizarse una medición del pico de una señal correspondiente a cada célula para
25 recuperar información de posición. Sin embargo, la coincidencia distorsiona las mediciones de los picos, lo que puede hacer que una representación de la célula se encuentre en una ubicación incorrecta en los histogramas y diagramas de dispersión correspondientes. Esta degradación del patrón de datos se vuelve más prevalente a medida que aumenta la concentración de muestra. Por ejemplo, una muestra 103 de partículas diluida con una concentración de partículas mayor dará como resultado, en general, en una mayor tasa de coincidencia y, por tanto,
30 datos más distorsionados que una muestra 103 de partículas diluida con una concentración de partículas menor.

En las figuras 2A y 2B, los rectángulos delimitadores marcados, los rectángulos 202 y 204 respectivamente, son ubicaciones donde se espera que los linfocitos estén presentes. La figura 2A muestra un número sustancial de linfocitos colocados incorrectamente fuera del rectángulo 202, que pueden clasificarse fácilmente de manera errónea
35 como otros tipos de WBC. En contraposición, en la figura 2B, los linfocitos mal colocados se reducen notablemente porque esos linfocitos mal colocados eran en realidad partículas coincidentes que se eliminan mediante identificación y gestión de coincidencia, según una realización de la presente invención.

La figura 3 ilustra gráficos que muestran una mejora a modo de ejemplo en la precisión clínica producida por una
40 realización de la presente invención. Por ejemplo, se muestra una comparación de los resultados de una prueba diferencial de 5 partes con los resultados diferenciales manuales en un conjunto de datos de referencia con y sin identificación y gestión de coincidencia, según una realización de la presente invención. La comparación se basa en los porcentajes de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos, y se cuantifica con la correlación con el diferencial manual. Tal como puede observarse en este ejemplo, la identificación y la gestión de coincidencia
45 mejoran la precisión de las cinco subpoblaciones de glóbulos blancos. Además de la mejora de la precisión, la identificación y gestión de coincidencia mejoran el número de muestras marcadas como indeterminadas que deben volver a ejecutarse. Por ejemplo, en el mismo conjunto de datos, el número de muestras marcadas se reduce en un 24,5% desde 351 hasta 265 debido a la aplicación de la identificación y gestión de coincidencia según una
50 realización de la presente invención.

Las figuras 4A y 4B ilustran gráficamente los resultados cuando se utiliza una realización de la presente invención para reducir el impacto de la coincidencia producida por partículas no lisadas. Algunas pruebas de hematología requieren la lisis de la muestra de partículas para retirar las partículas no deseadas de una muestra antes del análisis. Por ejemplo, una prueba diferencial de 5 partes requiere la retirada de los glóbulos rojos dominantes para
55 contar y diferenciar con precisión los subtipos de glóbulos blancos. Sin embargo, algunas muestras anómalas son resistentes al lisado y producen un exceso de residuos no lisados en los diagramas de dispersión diferenciales de 5 partes. Debido a la diferencia relativamente grande en la concentración entre glóbulos rojos y glóbulos blancos en estas muestras, los residuos no lisados a menudo pasan por la región de medición de manera coincidente. Por tanto, utilizando una realización de la presente invención, la eliminación sustancial de partículas coincidentes puede
60 reducir las imprecisiones causadas por residuos no lisados. Por ejemplo, al aplicar la identificación y gestión de coincidencia según una realización de la presente invención a un conjunto de datos de referencia, el promedio del porcentaje de residuos no lisados con respecto a los glóbulos blancos se reduce desde el 95% hasta el 64%.

En las figuras 4A y 4B, se muestran los diagramas de dispersión de CC frente a LS para una muestra con residuos
65 no lisados. Cuando no se aplica identificación y gestión de coincidencia, el residuo no lisado interfiere con los linfocitos y da como resultado una clasificación errónea del 48% de las células como linfocitos. Por ejemplo, en la

5 figura 4A las poblaciones de glóbulos rojos y linfocitos aparecen sin una separación clara en la zona 401. Por otro lado, la figura 4B muestra gráficamente los resultados cuando se usa la identificación y gestión de coincidencia, que retira una cantidad significativa de residuos no lisados, de modo que la selección entre los linfocitos y los residuos se mejora sustancialmente, por ejemplo, los glóbulos 402 rojos y los linfocitos 403 están claramente separados. En este ejemplo, la identificación y gestión de coincidencia produce un 7,2% de linfocitos, lo que está muy cerca de la referencia del 9%.

Método para determinar partículas coincidentes

10 La figura 5 es un diagrama de flujo de un método 500 para detectar y gestionar partículas coincidentes, según una realización de la presente invención. Por ejemplo, el método 500 puede realizarse utilizando el dispositivo de las Figs. 1A, a la que se hace referencia en la descripción del método 500 a continuación.

15 En la etapa 502, se prepara una muestra para su análisis en un analizador de partículas. Por ejemplo, tal como se comentó anteriormente, en el análisis de hematología puede lisarse una muestra de sangre para retirar los glóbulos rojos antes de una prueba diferencial de 5 partes para los glóbulos blancos. La etapa de preparación también puede incluir añadir un diluyente a la muestra y proporcionar un fluido de envolvente para facilitar el flujo de la muestra a través de una celda de flujo, por ejemplo, la celda 108 de flujo.

20 En la etapa 503, la muestra de partículas preparada se inyecta en la celda de flujo a una velocidad constante. Por ejemplo, esto puede hacerse usando un procedimiento tal como el enfoque hidrodinámico para garantizar una velocidad sustancial y constante del fluido y restringir las partículas dentro del fluido envolvente a través de la celda de flujo.

25 En la etapa 504, se detectan partículas en una región de medición. Por ejemplo, a medida que una submuestra de la muestra de partículas preparada en la etapa 502 fluye a través de la región de medición de una celda de flujo, se genera una secuencia de impulsos de señal basándose en la detección de una o más partículas dentro de una región de medición, por ejemplo, la región 120 de medición de la celda 108 de flujo. En un ejemplo, la detección de partículas se basa en uno o más de dispositivos de medición eléctricos u ópticos que incluyen sondas y sensores correspondientes, por ejemplo, las sondas 112 y los sensores 114. Por ejemplo, considerando un dispositivo de medición eléctrico, puede usarse un parámetro de medición de CC o un parámetro de medición de resistencia eléctrica para detectar el volumen de partículas, y/o un parámetro de medición de RF puede corresponder a varias características de las partículas. Una fuente de láser y detectores correspondientes, tal como se comentó con respecto a la figura 1A, puede comprender un dispositivo de medición óptica y puede utilizarse para determinar las características de las partículas basándose en parámetros de medición que incluyen LS y ALL. En otra realización, puede usarse un dispositivo de medición acústica. Por ejemplo, una fuente de ultrasonido y los sensores correspondientes pueden comprender un dispositivo de medición acústica. A continuación en el presente documento, la descripción se centra principalmente en la detección utilizando un parámetro de medición de CC, pero se contemplan otros esquemas de medición dentro del alcance de las realizaciones de esta invención.

40 En la etapa 506, se produce una señal correspondiente a la presencia de la partícula en la región de medición. Por ejemplo, se usa una secuencia de mediciones de impulsos de señal generadas al detectar la partícula cuando la partícula pasa por la región de medición. Señales tal como se muestra en la figura 1B o 1C pueden ser representativas de la señal producida en esta etapa.

45 En la etapa 508, se determinan diversos parámetros en función de la señal generada. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1B, se determina un pico 152 de la señal. En una realización de la presente invención, se determinan los puntos primero y segundo en la señal 150 que tienen un valor que corresponde a una parte predeterminada del valor de pico, estando el primer punto en la parte ascendente de la señal 150 y estando el segundo punto en la parte decreciente de la señal 150. Más precisamente, el primer punto está ubicado en la primera parte ascendente que se produce temporalmente de la señal 150 correspondiente a la parte predeterminada del valor de pico y el segundo punto está ubicado en la última parte descendente que se produce temporalmente de la señal 150 correspondiente a la parte predeterminada del valor de pico. Por ejemplo, los puntos primero y segundo pueden ser los puntos 154 y 156 de mitad de pico de la señal 150, o los puntos 164 y 166 de mitad de pico de la señal 160. Basándose en los puntos primero y segundo, se determina un punto central correspondiente al valor de la señal en el punto medio (H50) del intervalo de tiempo entre los puntos primero y segundo (T50). En otra realización, se determina el área de la señal. Específicamente, se determina el área representada por la señal que representa la duración total de la partícula en la región de medición. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 6, comentada en detalle a continuación, se comentan etapas a modo de ejemplo para determinar los parámetros mencionados. En las figuras 1B y 1C se proporcionan señales de ejemplo que representan una o más partículas en la duración de su presencia en una celda de flujo. Los parámetros determinados usando la señal se describen en detalle con respecto a las figuras 1B, 1C y 7.

65 En la etapa 510, se determinan las características de coincidencia de la submuestra. Por ejemplo, los datos de eventos, es decir, los datos correspondientes a las partículas detectadas y otros parámetros determinados basándose en la señal en la etapa 508 se reciben en el analizador 122 desde el procesador 118 de señales. El

analizador 122 puede determinar entonces las características de coincidencia de la submuestra basándose en los datos recibidos. Sin embargo, debe entenderse que la determinación de los parámetros de la señal y la determinación de la coincidencia pueden distribuirse de manera diferente entre el procesador 118 de señales y el analizador 122.

5 Por ejemplo, basándose en los parámetros determinados a partir de la señal, el pico y uno o ambos del punto central y los puntos primero y segundo de la señal, se determina si la submuestra incluye partículas coincidentes. En la figura 8 se representa un diagrama de flujo que ilustra el procesamiento detallado implicado en la etapa 510. La determinación de si la submuestra incluye eventos coincidentes se describe en detalle con respecto a la figura 8.

10 En la etapa 512, se generan datos de resultados basándose en los eventos coincidentes y eventos no coincidentes (es decir, eventos distintos de los eventos coincidentes). En una realización, se descartan los datos característicos de los eventos coincidentes. Por tanto, los datos de resultados no incluirán ningún evento detectado como coincidente. En otra realización, para cada evento coincidente detectado, se ajusta un recuento de partículas para tener en cuenta la coincidencia. Por ejemplo, puede considerarse que cada submuestra que se ha detectado que tiene coincidencia, tiene una coincidencia de dos partículas, y el recuento de eventos o el recuento de partículas puede aumentarse en consecuencia. Ajustar el recuento de partículas de esta manera puede reducir el error en el recuento cuando se compara con descartar la muestra coincidente.

20 En la etapa 514, se determina si se ha medido una muestra completa. En caso negativo, el método 500 vuelve a la etapa 503. De lo contrario, los datos de resultados recogidos se analizan en la etapa 514.

25 En una realización, los datos de resultados pueden usarse para generar una visualización, por ejemplo, un diagrama de dispersión correspondiente a los datos de resultados. El diagrama de dispersión tendría mayor precisión y menos ruido porque los eventos coincidentes se reducirían sustancialmente. En la figura 2B se muestra un diagrama de dispersión de ejemplo donde se eliminaron los eventos coincidentes, que puede compararse con cuando no se eliminan los eventos coincidentes, que se muestra en la figura 2A.

30 En otra realización, los resultados pueden notificarse como recuentos de eventos o partículas ajustados según el número de eventos coincidentes que se determinaron utilizando el método 500.

Aún en otras realizaciones, los datos de resultados pueden transmitirse a otro dispositivo incluyendo, pero sin limitarse a, un dispositivo de almacenamiento, para su almacenamiento y/o análisis posterior.

35 La figura 6 ilustra un procedimiento 600, por ejemplo, las subetapas implicadas en el procesamiento de la etapa 508, según una realización de la presente invención. En la etapa 602, se detecta un pico de la señal, por ejemplo el pico 152 de la señal 150. Tal como se comentó anteriormente, la medición del pico puede considerarse representativa de las características de las partículas. Por ejemplo, si una partícula individual pasa por una región de medición de CC, el pico registrado es proporcional al volumen físico de las partículas, según el principio de Coulter. De manera convencional, en algunos analizadores de hematología sólo se captura la medición del pico porque el valor de pico, por sí solo, es suficiente para describir determinadas características de las partículas. Cuando no hay partículas coincidentes presentes, la señal generalmente comprende un pico individual. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente con respecto a la figura 1C, una señal puede tener más de un pico cuando se detectan partículas coincidentes en la submuestra. La señal 160 tiene dos picos 162A y 162B, que indican que puede haber partículas coincidentes. El pico 162A, más específicamente el pico máximo de la señal 160, puede determinarse mediante el seguimiento del valor más alto de la señal.

50 En la etapa 604, se determinan dos puntos, los puntos primero y segundo, que tienen un valor de señal correspondiente a una parte predeterminada del pico. Por ejemplo, la parte predeterminada del pico puede ser del 50%, y pueden encontrarse dos puntos de mitad de pico, de manera que el primer punto 164 de mitad de pico es anterior y el segundo punto 166 de mitad de pico es posterior al pico 162A, tal como se describió anteriormente con respecto a la figura 1C. El intervalo de tiempo entre los puntos de mitad de pico primero y segundo se denomina T50.

55 En la etapa 606, se determina un punto 167 central entre los puntos primero y segundo. El valor de la señal en el punto 167 central de los puntos de mitad de pico primero y segundo se denomina H50. Debe indicarse que cuando no hay coincidencia, tal como se muestra en la figura 1B, el punto central de los puntos 154 y 156 de mitad de pico puede solaparse con el pico 152.

60 La figura 7 ilustra una propiedad sustancialmente constante de una medición (T50) en señales no coincidentes a medida que aumenta el tamaño de las partículas, según una realización de la invención. Tal como se indicó anteriormente, T50 es el intervalo de tiempo entre dos puntos de mitad de pico en una señal. Cada punto en la señal representa la intensidad de interacción del parámetro de medición (por ejemplo, CC) y la partícula en la ubicación correspondiente en una región de medición. Cuando el volumen de partícula es pequeño en comparación con el volumen de la región de medición de CC, la intensidad es aproximadamente proporcional al volumen de partícula. Cuando una partícula más grande pasa por la región de medición, cada punto en la señal aumenta

proporcionalmente y los puntos de mitad de pico permanecen en los mismos puntos temporales mientras la amplitud aumenta en comparación con una partícula más pequeña. En otras palabras, T50 permanece sustancialmente constante independientemente del tamaño de partícula, siempre y cuando las partículas pasen por la región de medición independientemente sin coincidencia. El diagrama 700 muestra que T50 permanece sustancialmente constante temporalmente para diversos tamaños de partículas sin coincidencia. La propiedad sustancialmente constante de T50 para partículas individuales no coincidentes de tamaños variables permite la determinación de un valor de T50 umbral para identificar partículas coincidentes.

La medición de H50 depende en gran medida de la simetría de la forma de la señal. Si una señal es simétrica y unimodal, su H50 es igual a su pico. Si una señal es unimodal pero asimétrica, su H50 es menor que su pico. Si una señal es bimodal, su H50 habitualmente se ubica en la región de valle media en la señal bimodal y su H50 es significativamente menor que el pico. Si una señal es multimodal, lo que puede suceder cuando más de dos partículas fluyen a través de la región de medición simultáneamente, la situación es más complicada e impredecible. Sin embargo, hay una probabilidad muy alta de que el H50 sea menor que el pico en esta situación. Además, la coincidencia de más de dos partículas es relativamente infrecuente en los analizadores de hematología y los citómetros de flujo que usan el enfoque hidrodinámico para inyectar la muestra de partículas en la celda de flujo y, en general, puede ignorarse.

Debe indicarse que para facilitar la referencia, el término T50 se usa para referirse a la distancia temporal entre los puntos primero y segundo cuando se elige que los puntos primero y segundo tengan cualquier valor predeterminado correspondiente a una parte del valor de pico. Asimismo, el término H50 se usa para referirse al valor de la señal en el punto medio de la región T50.

En la etapa 608, se determina el área de la señal. Por ejemplo, el área de la señal 160 correspondiente a la duración total en que la partícula está en la región de medición, específicamente en el intervalo de tiempo entre cuando la partícula entró en la región 168 de medición y cuando salió de 169. En un ejemplo, el área puede determinarse como la integral de la señal 160. Si una partícula más grande pasa por la región de medición, cada punto en la señal aumenta proporcionalmente. Si más de una partícula pasa por la abertura, el área de las señales superpuestas es igual a la suma de las áreas de todas las señales individuales. Sin embargo, el área de señal puede ser sensible a la forma de una partícula y la orientación de la partícula cuando pasa por la región de medición. En comparación con el área de la señal, el T50 de la señal proporciona una representación más sólida de la partícula que está analizándose. También debe indicarse que, a excepción de las partículas perfectamente coincidentes, el pico no tiene la propiedad aditiva.

La figura 8 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento 800, por ejemplo, determinando las características de coincidencia en la etapa 510, según una realización de la presente invención. En la etapa 802, el parámetro T50 se compara con un valor umbral de T50 predeterminado. Si el valor de T50 es mayor que el valor umbral de T50 predeterminado, entonces se considera que la señal incluye una coincidencia. El valor umbral de T50 puede predeterminarse para cada analizador de partículas y las condiciones de prueba asociadas basándose en el análisis de las muestras de partículas de referencia.

Las figuras 9, 10, 11 y 12 son gráficos que ilustran características de parámetros de partículas, según una realización de la presente invención. Por ejemplo, la línea representa mediciones de señal de partículas no coincidentes en un intervalo de tamaño de 0,2 a 0,8 en una escala normalizada. Los círculos y la línea de puntos representan las mediciones de señal de dos partículas coincidentes de tamaño 0,4 cuya separación se ajusta en pequeños incrementos de tiempo. Debido a que estas dos partículas pasan por la región de medición muy cerca una de la otra, el pico observado no es necesariamente 0,4 debido a la superposición de la forma de onda. Los círculos representan las mediciones de señal de dos partículas de igual tamaño antes de la bifurcación. La línea de puntos representa las mediciones de señal después de la bifurcación.

La figura 9 muestra un diagrama 900 de T50 frente a pico, según una realización de la presente invención. Las señales de partícula individual tienen una T50 constante independientemente de la diferencia de tamaño, ilustrada por la línea horizontal que representa las partículas individuales. Los impulsos de coincidencia de antes de la bifurcación, mostrados con los círculos, muestran T50 elevados a pesar de que todavía son unimodales. Esto se debe a que las señales se distorsionan debido a la superposición de dos señales individuales. Una vez que la coincidencia pasa a ser después de la bifurcación, T50 aumenta considerablemente, tal como lo ilustra la línea de puntos. Las observaciones anteriores indican que T50 puede diferenciar los eventos coincidentes tanto antes de la bifurcación como después de la bifurcación de los eventos no coincidentes. Puede determinarse que el valor umbral de T50, basándose en el tamaño de las partículas que se analizan, está por encima del valor de las partículas individuales (línea en el diagrama 900) y por debajo del valor del valor de partícula coincidente correspondiente (menor de la línea de puntos o círculos en el diagrama 900).

En la etapa 804, se determina o calcula una razón del punto central de la parte primera y segunda de los puntos de pico con respecto al pico (es decir, la razón de H50 con respecto a pico). La razón de H50 con respecto a pico se compara entonces con una razón de H50 con respecto a pico umbral predeterminada. Si la razón de H50 con respecto a pico es menor que el umbral, entonces se determina que la señal indica una coincidencia después de la

bifurcación. La razón de H50 respecto a pico umbral puede determinarse previamente para cada analizador de partículas y pueden asociarse condiciones de prueba basándose en el análisis de muestras de partículas de referencia.

5 En el diagrama 1000 de H50 frente a pico de la figura 10, hay una línea diagonal porque H50 y el pico permanecen iguales para las señales de partícula individual. Los círculos se solapan con la línea siempre que dos partículas coincidentes antes de la bifurcación del mismo tamaño forman una señal simétrica, unimodal y tienen H50 y picos iguales. Esto significa que H50 no puede diferenciar señales coincidentes y no coincidentes antes de la bifurcación. Sin embargo, la línea de puntos es claramente independiente de la línea, lo que implica que H50 puede usarse para
10 distinguir las señales de coincidencia después de la bifurcación de las señales de no coincidencia. En el caso de dos partículas coincidentes antes de la bifurcación de diferentes tamaños, la superposición de dos partículas crea un nivel de asimetría y, por tanto, hace que las mediciones de H50 sean diferentes de la medición del pico. Sin embargo, esta diferencia habitualmente no es significativa.

15 En la etapa 806, se determina o calcula una razón del punto central de la parte primera y la segunda de los puntos de pico con respecto al área (es decir, la razón de H50 con respecto a área). La razón de H50 con respecto a área se compara con una razón de H50 con respecto a área umbral predeterminada. Si la razón de H50 con respecto a área es menor que el umbral, entonces se determina que la señal indica una coincidencia después de la bifurcación. La razón de H50 con respecto a área umbral puede determinarse previamente para cada analizador de partículas y
20 pueden asociarse condiciones de prueba basándose en el análisis de muestras de partículas de referencia.

En el diagrama 1100 de H50 frente a área de la figura 11, hay una línea diagonal recta porque la razón de H50 con respecto a área permanece constante para señales de partícula individual. Los círculos y la línea de puntos muestran que el área de señales coincidentes de dos partículas permanece constante. Esto puede explicarse por el
25 hecho de que el área de dos partículas es igual a la suma del área de cada partícula siempre que estas dos partículas pasen por la región de medición de manera coincidente. Por tanto, todas las partículas individuales forman una diagonal a través del origen en el diagrama de dispersión de área frente a área y tienen una razón de H50 con respecto a área constante, mientras que las partículas coincidentes se ubican a la derecha y por debajo de la línea de partículas individuales en el diagrama de dispersión y sus razones de H50 con respecto a área se reducen. Esto
30 puede implicar que la razón de H50 con respecto a área puede usarse para distinguir impulsos coincidentes (incluidos los tipos tanto antes de la bifurcación como después de la bifurcación) e impulsos no coincidentes.

En la etapa 808, se determina una razón de área con respecto a pico. Basándose en si la razón de área con respecto a pico es mayor que un umbral predefinido, esta señal es una señal coincidente o bien antes de la
35 bifurcación o bien después de la bifurcación. La razón de área con respecto a pico umbral puede determinarse previamente para cada analizador de partículas y pueden asociarse condiciones de prueba basándose en el análisis de muestras de partículas de referencia.

En el diagrama 1200 de área frente a pico que se muestra en la figura 12, el área de la señal de partícula individual (mostrada con la línea) aumenta proporcionalmente al pico. Por otro lado, el área de señales coincidentes de dos partículas, independientemente de que sea antes de la bifurcación (mostrado con los círculos) o después de la
40 bifurcación (mostrado con la línea de puntos), permanece constante, que es dos veces el área de señal de pico en 0,4. Esto puede explicarse por el hecho de que el área de dos partículas es igual a la suma del área de cada partícula siempre que estas dos partículas atraviesen la región de medición de manera coincidente. Por tanto, todas las partículas individuales forman una diagonal a través del origen en el diagrama de dispersión de área frente a pico
45 y tienen una razón de área con respecto a pico constante, mientras que las partículas coincidentes se ubican a la izquierda de y por encima de la línea de partícula individual en el diagrama de dispersión y sus razones de área con respecto a pico son elevadas. Esto puede implicar que la razón de área con respecto a pico puede usarse para distinguir impulsos coincidentes (incluidos los tipos de antes de la bifurcación y después de la bifurcación) e
50 impulsos no coincidentes.

Debe observarse que otras realizaciones de la presente invención pueden usar uno o más de los métodos para determinar eventos de coincidencia descritos anteriormente. En general, la comparación de T50 con un umbral predeterminado proporciona los resultados más sólidos. Sin embargo, algunas realizaciones también pueden incluir
55 la determinación de coincidencia a través de H50 con respecto a pico y/o área con respecto a pico, para aumentar la fiabilidad de la determinación.

Ejemplo de aplicación a una prueba diferencial de 5 partes

60 Las figuras 13, 14, 15, 16 y 17 ilustran la identificación de coincidencia en una muestra de sangre que contiene células sanguíneas de diversos tamaños, según una o más realizaciones de la presente invención. La muestra tiene una concentración normal de glóbulos blancos, lo que implica un nivel de coincidencia relativamente bajo. En la figura 13, se muestra un diagrama 1300 de dispersión diferencial de 5 partes que tiene un eje correspondiente al pico de CC y al pico de LS. La mayoría de los valores de T50 en esta muestra real son constantes, formando una
65 línea recta horizontal en la figura 14. El resto (ubicado dentro del rectángulo 1402) tiene valores de T50 más grandes e irregulares, que corresponden a señales identificadas como señales coincidentes antes de bifurcación o después

de bifurcación. La figura 14 corresponde a los resultados simulados para T50 frente a pico (figura 9).

La figura 15 muestra el diagrama 1500 de dispersión resultante cuando se proyectan señales coincidentes identificadas con los T50 en el espacio de H50 con CC frente al pico. La mayoría de los impulsos coincidentes identificados con los T50 presentan H50 más pequeños en comparación con los picos correspondientes, lo que indica que esos son impulsos coincidentes después de la bifurcación. Algunos de los impulsos coincidentes identificados con los T50 tienen H50 y picos equivalentes. Esos son impulsos coincidentes antes de la bifurcación, que pueden discriminarse con la razón de área con respecto a pico o T50, pero no con H50.

El patrón 1600 de dispersión del área de H50 con CC frente a CC mostrado en la figura 16 se compone de un evento que forma una diagonal que pasa por el origen y otros puntos dispersos debajo de la diagonal. La primera representa los glóbulos blancos no coincidentes. Los segundos forman una "nube" con razones de H50 con respecto a área inferiores y pueden representar partículas (1602) coincidentes.

También puede observarse en la figura 17 que el patrón 1700 de dispersión del área de CC frente al pico se compone de una diagonal que pasa por el origen y otros puntos dispersos por encima de la diagonal. La primera representa los glóbulos blancos no coincidentes. Los segundos forman una "nube" con razones de área con respecto a pico superiores y pueden representar partículas coincidentes. Si los puntos (1402) coincidentes en la figura 14 se comparan con puntos (1702) coincidentes en la figura 17, puede observarse que los resultados de la formación de umbral en T50 y la formación de umbral de la razón de área con respecto a pico coinciden entre sí.

Otras realizaciones de ejemplo

En otra realización de la presente invención, pueden usarse múltiples parámetros de medición, cada uno independientemente, para determinar eventos de coincidencia. Teniendo una coincidencia determinada de manera independiente utilizando múltiples parámetros de medición, los resultados pueden correlacionarse para llegar a una determinación final. Un método de este tipo puede ofrecer una determinación más sólida de eventos coincidentes en la que se reducen los efectos de las sensibilidades de cada parámetro de medición en la detección de eventos coincidentes en diversas condiciones. Por ejemplo, puede hacerse una determinación final de una coincidencia para un evento que está marcado como coincidente por al menos uno de los parámetros de medición.

La figura 18 muestra otra realización de la presente invención. Un sistema 1800 según una realización de la presente invención incluye un detector 124 de partículas acoplado a un analizador 122. El analizador 122 también puede estar acoplado a una pantalla 1820 y al almacenamiento 1821. El detector 124 de partículas detecta eventos de partículas usando uno o más parámetros de medición, e incluye un procesador 118 de señales que procesa los parámetros de medición detectados para construir una señal para cada evento de partículas que representa la duración de esa partícula en una región de medición. El procesador 118 de señales, tal como se indicó anteriormente, determina un pico y uno o más de un área de señal o un parámetro T50 y H50 para cada señal. Las instrucciones para ensamblar la señal correspondiente a la duración de una partícula en la región de medición y la determinación de los parámetros correspondientes a esa señal pueden implementarse en cualquier lenguaje de programación adecuado, incluyendo un lenguaje de descripción de hardware (HDL), Assembly, C y C ++, y puede incluir uno o más componentes de hardware, firmware o software. En una realización, el ensamblaje de la señal y la determinación de los parámetros de la señal tales como pico, H50, T50 y área pueden realizarse en una matriz de puertas programable por campo (FPGA) y las comparaciones de umbral para coincidencia pueden realizarse en el software.

Tal como se describió con respecto a la figura 1 anteriormente, el analizador 122 o bien puede estar ubicado dentro del analizador 100 de partículas o bien puede estar ubicado por separado acoplado al detector 124 de partículas a través de un medio 1840 de comunicaciones. El analizador 122 recibe datos de eventos correspondientes a la señal generada por cada partícula detectada por el detector 124 de partículas. Los datos de eventos pueden incluir datos de posición así como parámetros calculados que incluyen las mediciones de pico, área de señal, T50 y H50 para la señal correspondiente.

El analizador 122 incluye componentes que incluyen un procesador 1802, un dispositivo 1803 de memoria, un dispositivo 1804 de almacenamiento, un dispositivo 1805 de entrada, un dispositivo 1806 de salida, un módulo 1807 de coincidencia y un dispositivo 1808 de comunicaciones. El procesador 1802 puede ser cualquier microprocesador u otro procesador que pueda ejecutar instrucciones de procesamiento. El dispositivo 1803 de memoria puede incluir una memoria de acceso aleatorio. El dispositivo 1804 de almacenamiento incluye un medio de almacenamiento persistente, como una memoria flash o un disco duro. El procesador 1802 ejecuta las instrucciones para recibir datos de eventos del analizador de partículas, procesar los datos recibidos y emitir los datos de resultados procesados. El dispositivo 1803 de memoria y el dispositivo 1804 de almacenamiento proporcionan cualquier requisito de memoria y almacenamiento temporal o permanente del procesador 1802. El dispositivo 1808 de comunicación interconecta los componentes del analizador 122 entre sí, y puede incluir un medio de comunicación incluyendo, pero sin limitarse a, un bus de interconexión de componentes periféricos (PCI) o bus de arquitectura estándar industrial extendida (EISA). El dispositivo 1805 de entrada puede incluir conectividad con el analizador 100 de partículas a través del dispositivo 1840 de conexión y la capacidad para recibir datos, incluyendo datos de evento del analizador 100 de

partículas. La conexión 1840 puede ser un dispositivo de conexión de red tal como Ethernet o un dispositivo de conexión interno del dispositivo tal como un bus PCI o EISA.

5 El módulo 1807 de coincidencia incluye la funcionalidad para procesar los datos de evento, incluyendo los datos de posición y los parámetros de señal correspondientes recibidos desde el detector 124 de partículas para determinar la coincidencia en cada evento. Por ejemplo, tal como se describió anteriormente, el módulo 1807 de coincidencia puede usar uno o más de los parámetros de pico, área de señal, T50 y H50 para determinar la existencia de un evento coincidente en la submuestra correspondiente de la muestra de partículas. En algunas realizaciones, el módulo 1807 de coincidencia puede recibir parámetros de señal determinados independientemente usando múltiples parámetros de medición, y correlacionar las diferentes determinaciones para llegar a una determinación final con respecto a la coincidencia en el evento correspondiente.

15 El módulo 1806 de salida incluye la funcionalidad para gestionar los eventos coincidentes de una manera apropiada para la aplicación. En una realización, el módulo de salida puede ajustar uno o más recuentos de partículas teniendo en cuenta eventos de coincidencia. Por ejemplo, cada evento coincidente puede hacer que un recuento de partículas correspondiente aumente en 2 en lugar de 1. En otra realización, el módulo 1806 de salida puede eliminar eventos que se ha determinado que son coincidentes. Por ejemplo, pueden generarse datos de resultados excluyendo cualquiera de los eventos detectados como coincidentes. Las instrucciones para lograr la funcionalidad del módulo 1805 de entrada, el módulo 1807 de coincidencia y el módulo 1806 de salida pueden implementarse utilizando hardware, firmware, software o una combinación de los mismos.

25 El módulo 1806 de salida se acopla utilizando un dispositivo 1850 de comunicaciones a la pantalla 1820 y/o al dispositivo 1821 de almacenamiento. El medio 1850 de comunicaciones puede incluir una conexión de red tal como Ethernet o un método de conexión interno del dispositivo tal como un bus PCI o EISA. Los datos de resultados procedentes del módulo 1806 de salida se transportan a la pantalla 1820 para que un operador los visualice y analice. Por ejemplo, la pantalla 1820 puede ilustrar los datos de resultados en forma de un diagrama de dispersión (un ejemplo del cual se muestra en la figura 2B). En otra realización, los datos de resultados pueden almacenarse simplemente en un dispositivo 1821 de almacenamiento externo para su posterior procesamiento y análisis.

30 En esta divulgación, se han dado a conocer métodos y sistemas que pueden mejorar el análisis de precisión de partículas, incluyendo el análisis de muestras de sangre, a través de la identificación y gestión de eventos de coincidencia que se producen en la detección de eventos. Los métodos y sistemas dados a conocer producen mejoras sustanciales con respecto a los métodos y sistemas actuales y pueden conducir a mejoras significativas en el análisis de los datos del analizador de partículas. Los expertos en la técnica entenderán que las técnicas dadas a conocer en el presente documento pueden aplicarse a varias partículas biológicas o industriales y también puede aplicarse a varios métodos de detección que utilizan dispositivos de medición eléctricos, ópticos o acústicos.

40 La descripción anterior de la invención se ha presentado con fines de ilustración y descripción. No pretende ser exhaustiva ni limitar la invención a la forma precisa dada a conocer, y pueden ser posibles otras modificaciones y variaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas a la luz de las enseñanzas anteriores. La realización se eligió y describió para explicar mejor los principios de la invención y su aplicación práctica para permitir así que otros expertos en la técnica utilicen mejor la invención en diversas realizaciones y diversas modificaciones que sean adecuadas para el uso particular contemplado.

45

REIVINDICACIONES

1. Método de análisis de partículas en un analizador de partículas, que comprende:

5 preparar una muestra (103) de fluido que contiene partículas (107) para su análisis en el analizador (100) de partículas;
 detectar señales usando un dispositivo (110) de medición eléctrico u óptico, correspondiendo cada una de las señales a uno o más eventos detectados en una submuestra de la muestra (103) de fluido que fluye a través de una región (120) de medición en el analizador (100) de partículas, en el que el o cada evento es la detección de una partícula dentro de la región (120) de medición;
 10 determinar la existencia de eventos coincidentes en uno o más eventos basándose en:

 medir, para un parámetro de medición procedente de al menos uno de dichos dispositivos (110) de medición, un pico de cada una de las señales, en el que el pico es el valor de señal máximo de la señal, un área de cada una de las señales, los puntos primero y segundo de cada una de las señales que usan ese dispositivo (110) de medición, en el que los puntos primero y segundo tienen un valor de señal correspondiente a una parte predeterminada del pico, y el valor de señal (H50) en un punto central de cada una de las señales entre los puntos primero y segundo;
 15 comparar una razón del valor de la señal (H50) en el punto central del área con un valor umbral; y
 determinar la existencia de los eventos coincidentes si la razón es menor que la razón umbral;
 y
 20 generar datos de resultados basándose en los eventos coincidentes y eventos no coincidentes de uno o más eventos.

2. Método según la reivindicación 1, en el que los datos de resultados no incluyen los eventos coincidentes.

30 3. Método según la reivindicación 1, que comprende además:
 visualizar un gráfico de los datos de resultados, mediante lo cual el gráfico está sustancialmente libre de ruido de evento coincidente.

35 4. Método según la reivindicación 1, en el que la detección incluye un parámetro de medición de CC, un parámetro de medición de radiofrecuencia, un parámetro de medición de dispersión de luz o un parámetro de medición de pérdida de luz axial.

5. Método según la reivindicación 1, en el que las partículas (107) comprenden células biológicas.

40 6. Método según la reivindicación 1, en el que el analizador (100) de partículas es un analizador de hematología o un citómetro de flujo.

45 7. Método según la reivindicación 1, en el que los datos de resultados incluyen un recuento modificado de uno o más eventos, y en el que el recuento modificado se basa en los eventos coincidentes y los eventos no coincidentes.

8. Sistema (1800) para analizar partículas (107) en un analizador (100) de partículas, que comprende:

50 un detector (124) de partículas configurado para detectar señales usando un dispositivo (110) de medición eléctrico u óptico, correspondiendo cada una de las señales a uno o más eventos detectados en una submuestra de la muestra (103) de fluido que fluye a través de una región (120) de medición en el detector (124) de partículas, en el que el o cada evento es la detección de una partícula dentro de la región (120) de medición; y
 un analizador (122) configurado para:

55 determinar la existencia de eventos coincidentes en uno o más eventos basándose en:

60 medir, para un parámetro de medición procedente de al menos uno de dichos dispositivos de medición, un pico de cada una de las señales, en el que el pico es el valor de señal máximo de la señal, un área de cada una de las señales, los puntos primero y segundo de cada una de las señales que usan ese dispositivo (110) de medición, en el que los puntos primero y segundo tienen un valor de señal correspondiente a una parte predeterminada del pico, y el valor de señal (H50) en un punto central de cada una de las señales entre los puntos primero y segundo;
 65

comparar una razón del valor de la señal (H50) en el punto central del área con un valor umbral; y
determinar la existencia de los eventos coincidentes si la razón es menor que la razón umbral;

5 y
generar datos de resultados basándose en los eventos coincidentes y eventos no coincidentes de uno o más eventos.

10 9. Sistema según la reivindicación 8, en el que la detección es una de CC, dispersión de luz, pérdida de luz axial o radiofrecuencia.

10. Sistema según la reivindicación 8, que comprende además una pantalla configurada para visualizar los datos de resultados.

15 11. Medio de almacenamiento legible por ordenador que tiene un código de programa de ordenador grabado en el mismo que, cuando se ejecuta por un procesador, hace que el procesador realice un método de análisis de partículas (107) en un analizador (100) de partículas, siendo el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

20 12. Medio de almacenamiento legible por ordenador según la reivindicación 11, que comprende además instrucciones que, cuando el programa se ejecuta por un ordenador, hace que el ordenador lleve a cabo la etapa de visualizar un gráfico de los datos de resultados, mediante lo cual el gráfico está sustancialmente libre de ruido de evento coincidente.

25

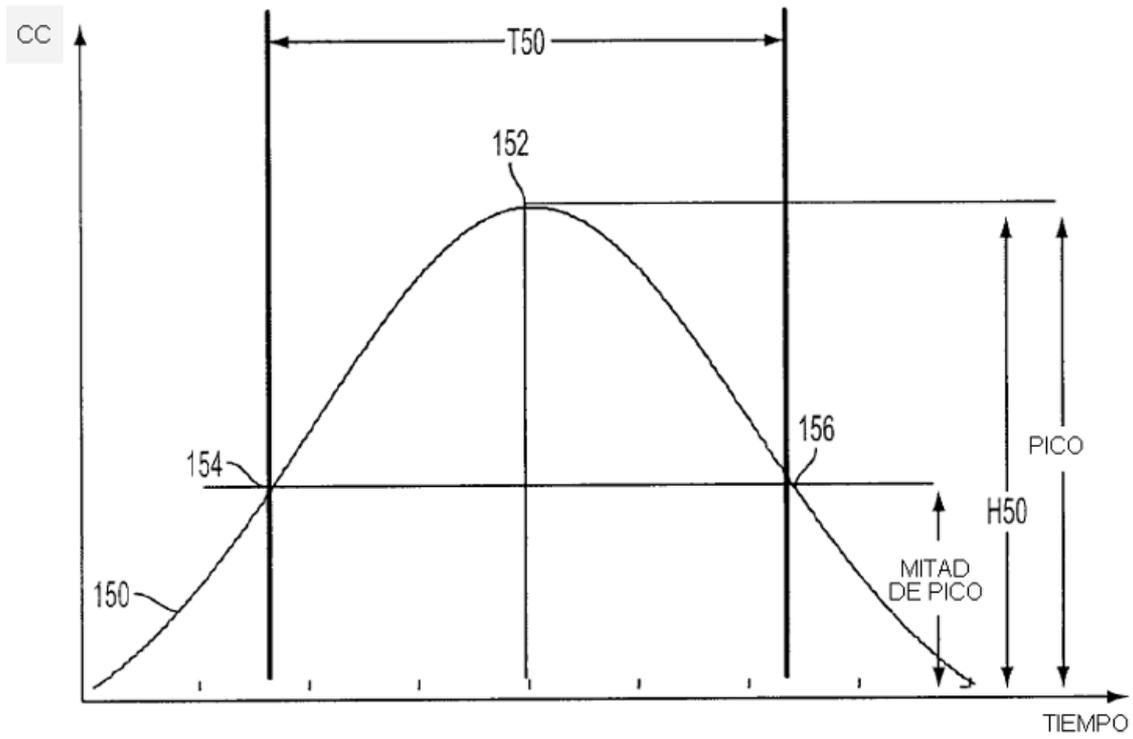


FIG. 1B

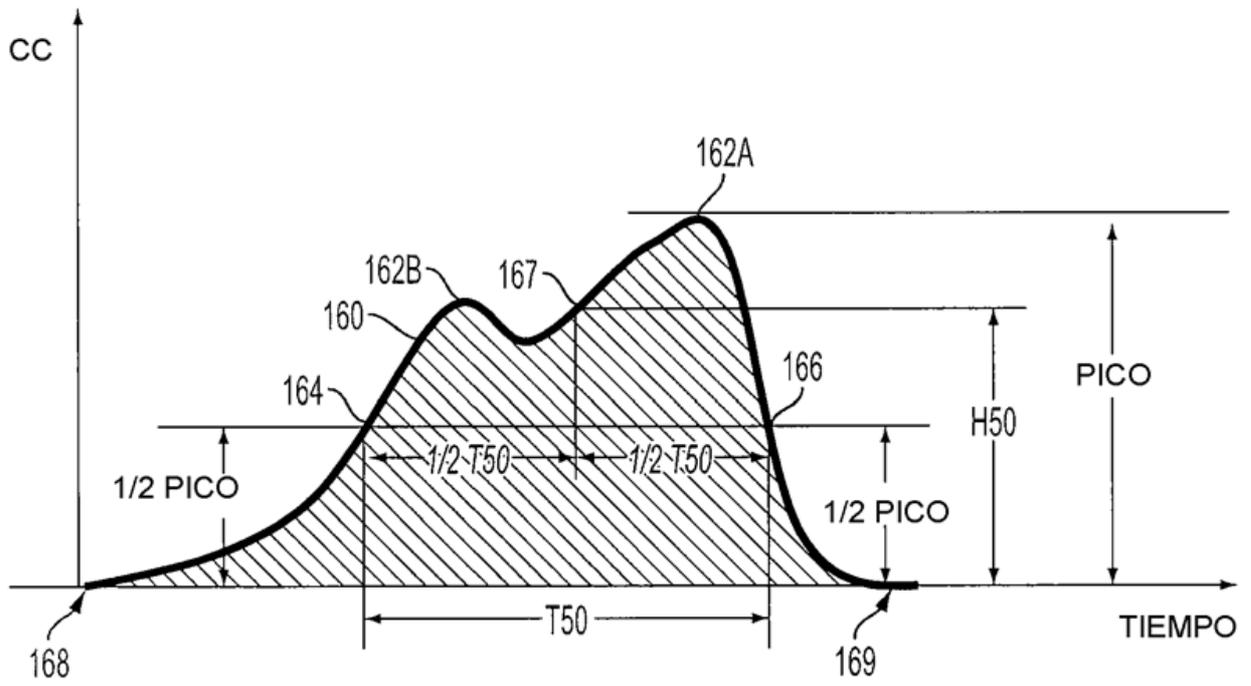


FIG. 1C

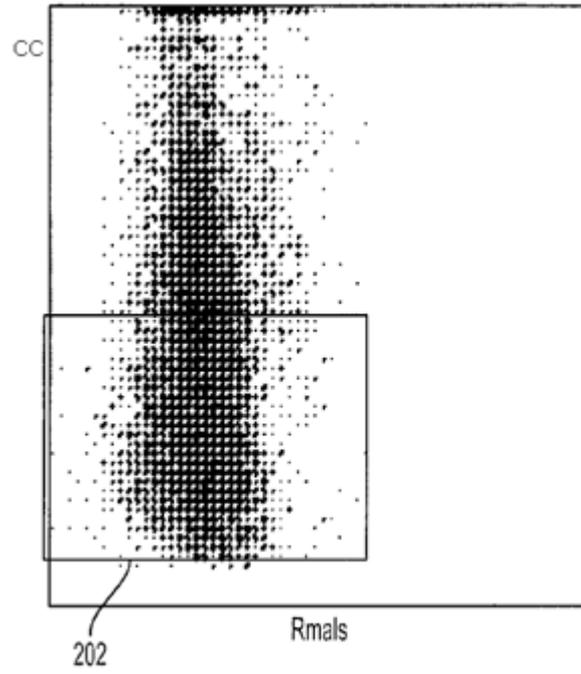


FIG. 2A

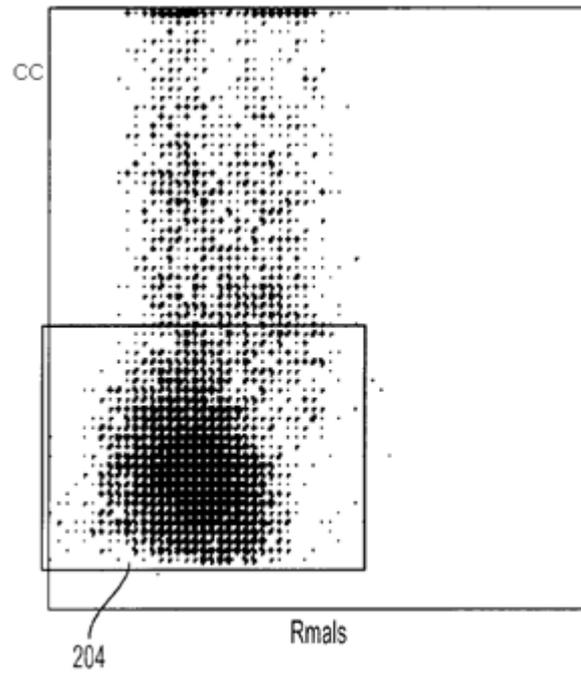


FIG. 2B

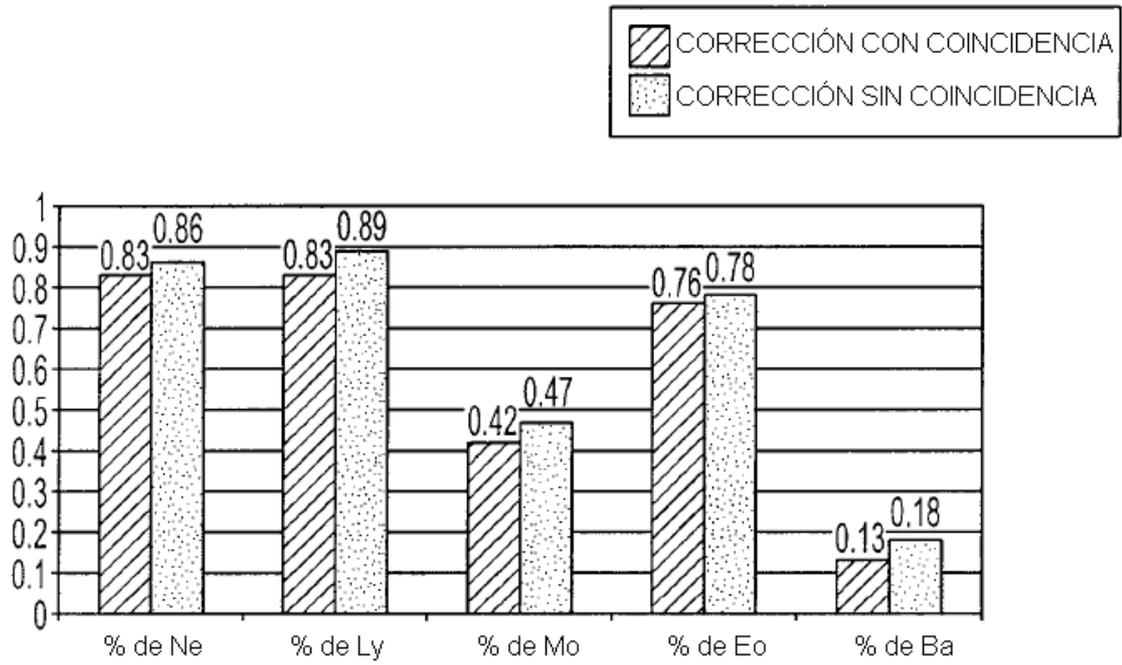


FIG. 3

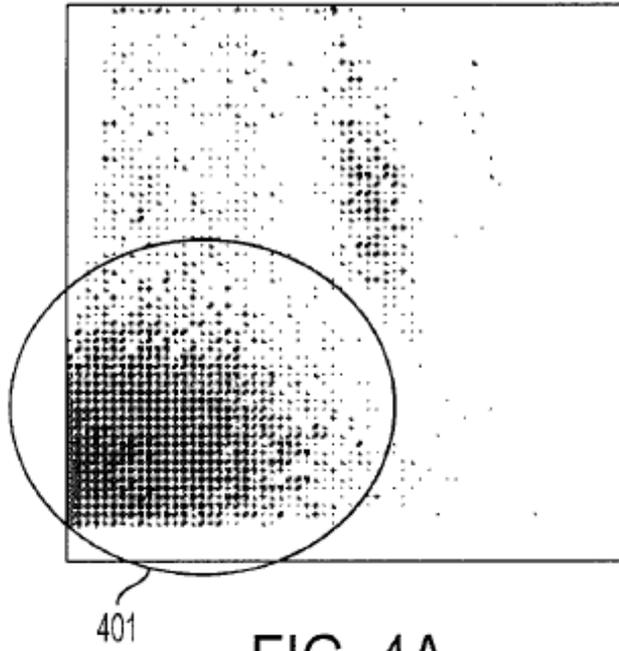


FIG. 4A

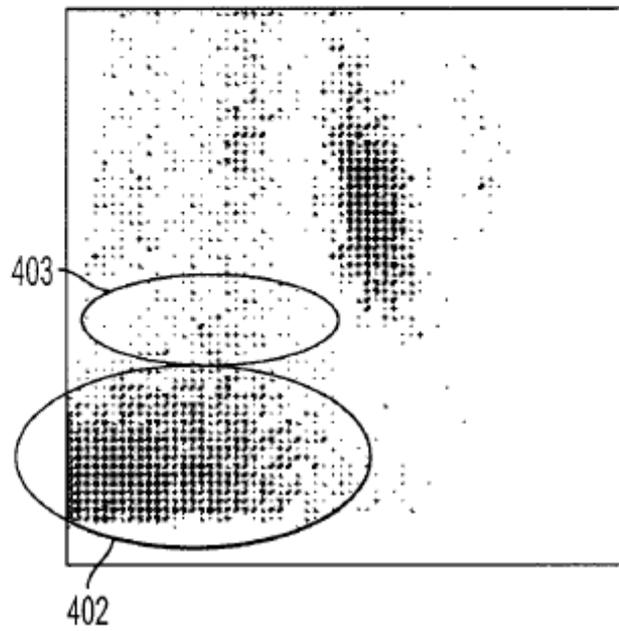


FIG. 4B

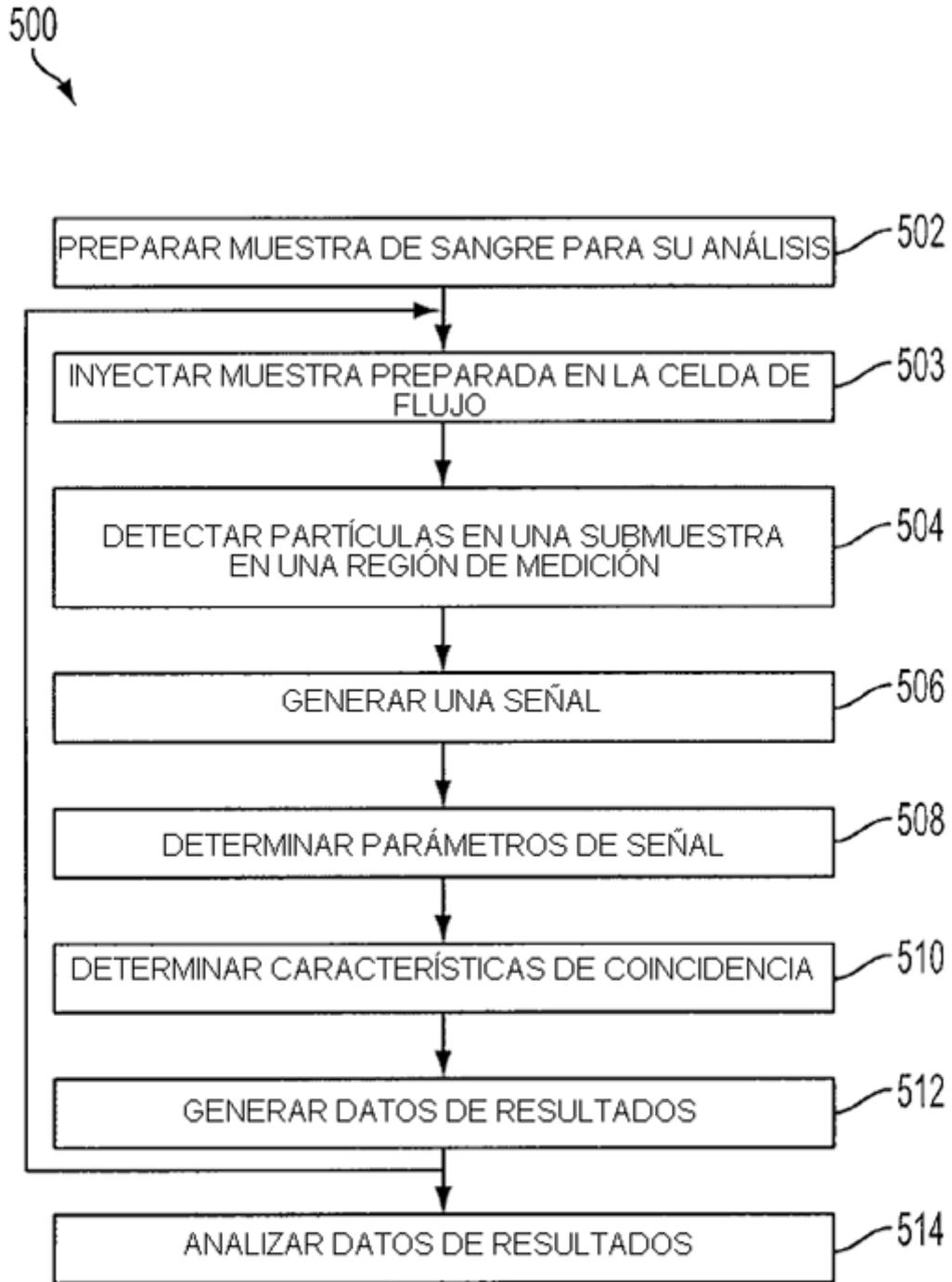


FIG. 5

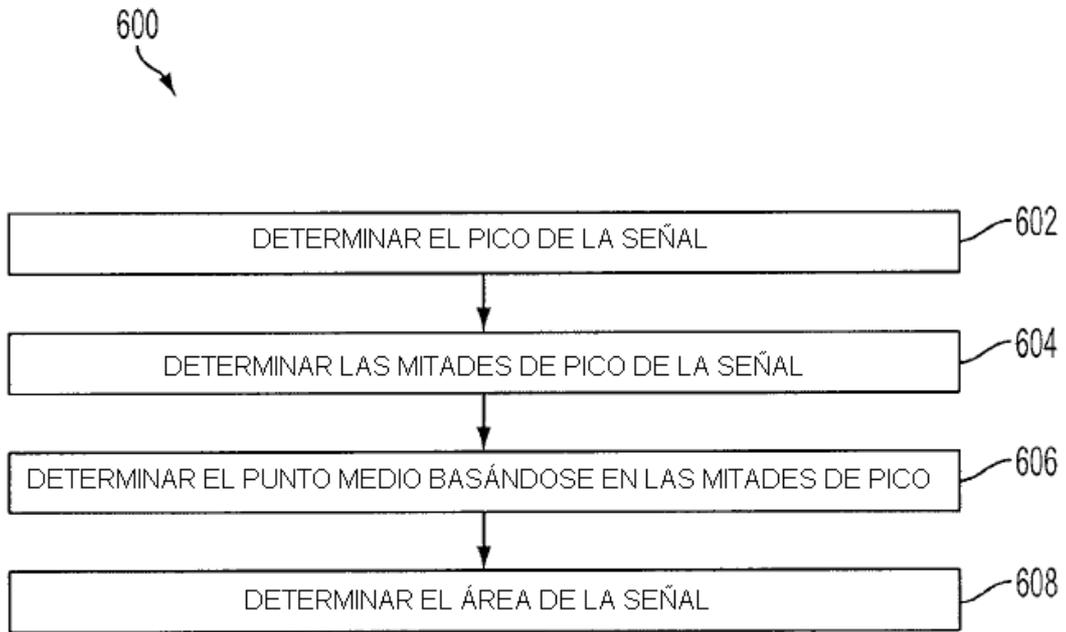


FIG. 6

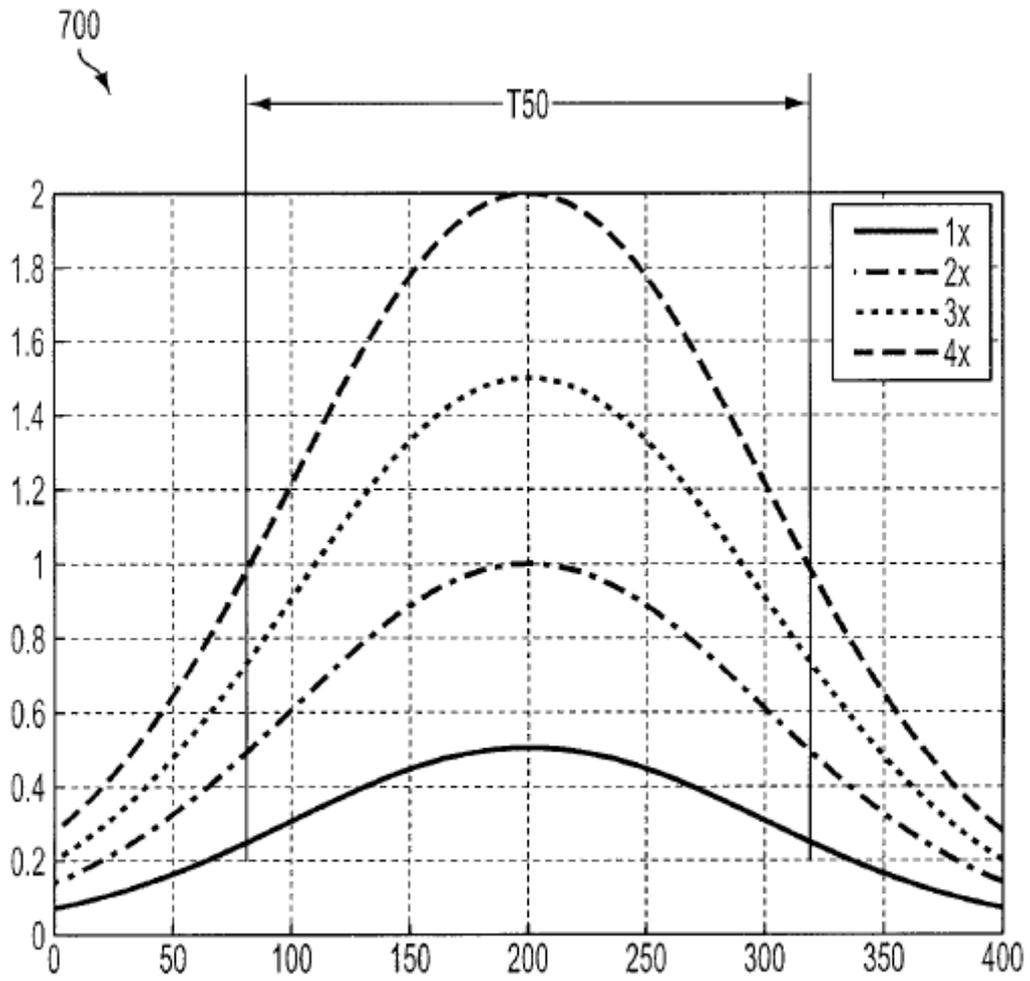


FIG. 7

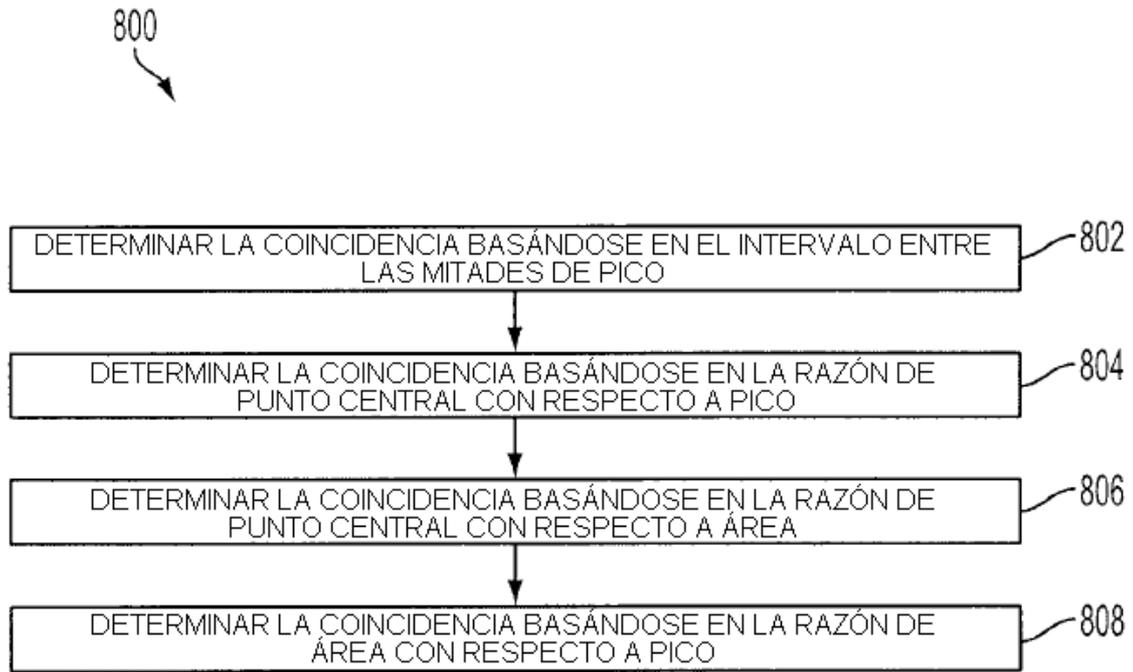


FIG. 8

900
↘

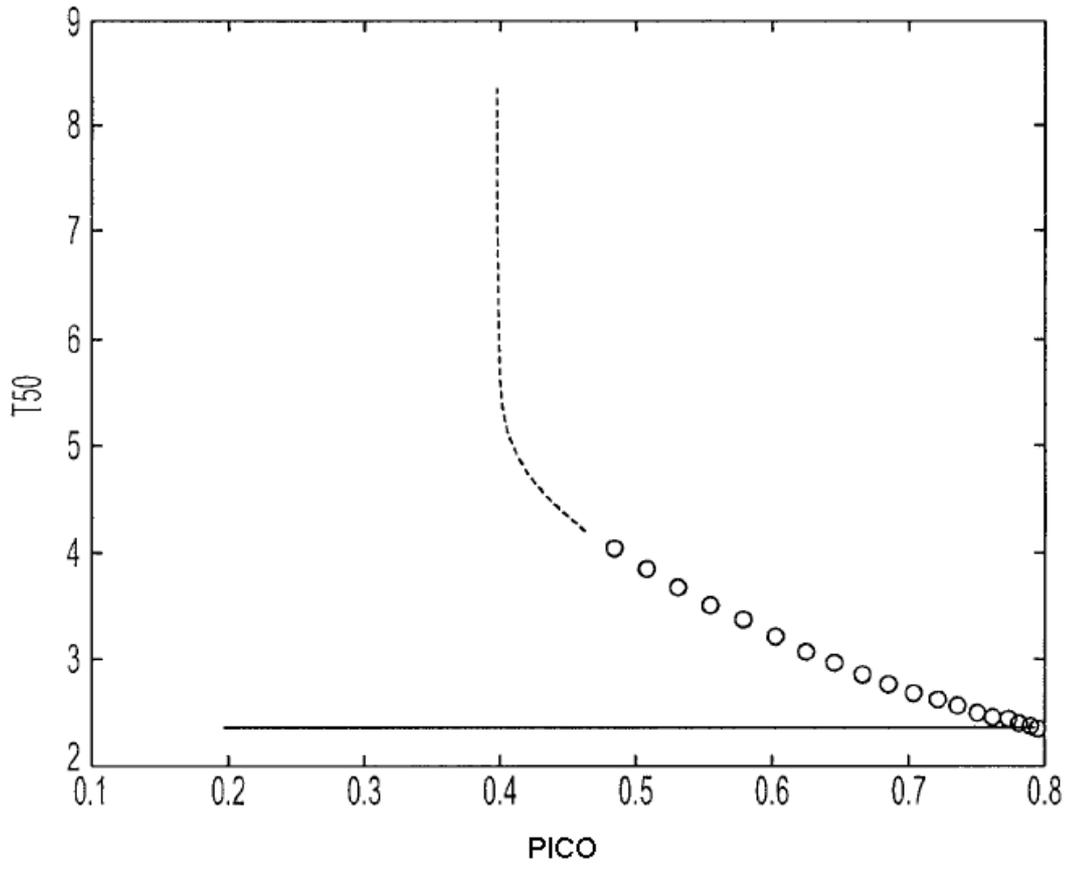


FIG. 9

1000
↙

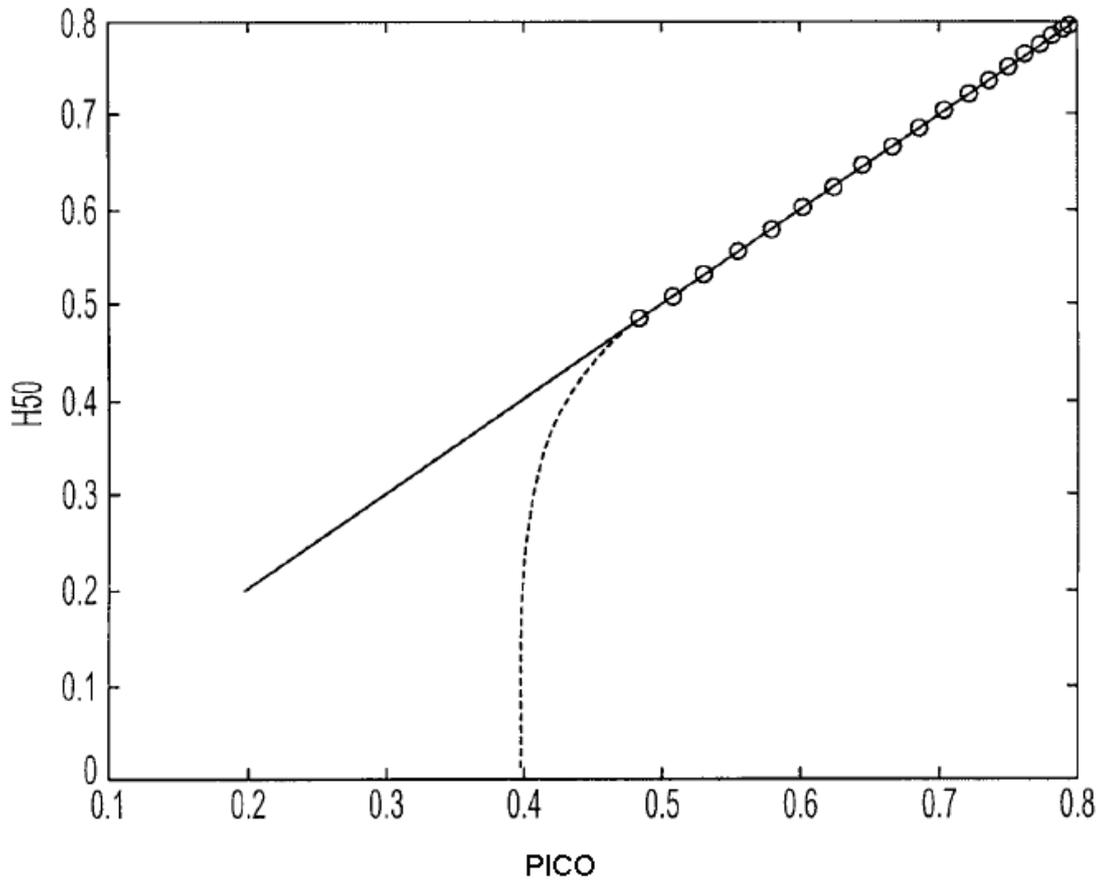


FIG. 10

1100 ↘

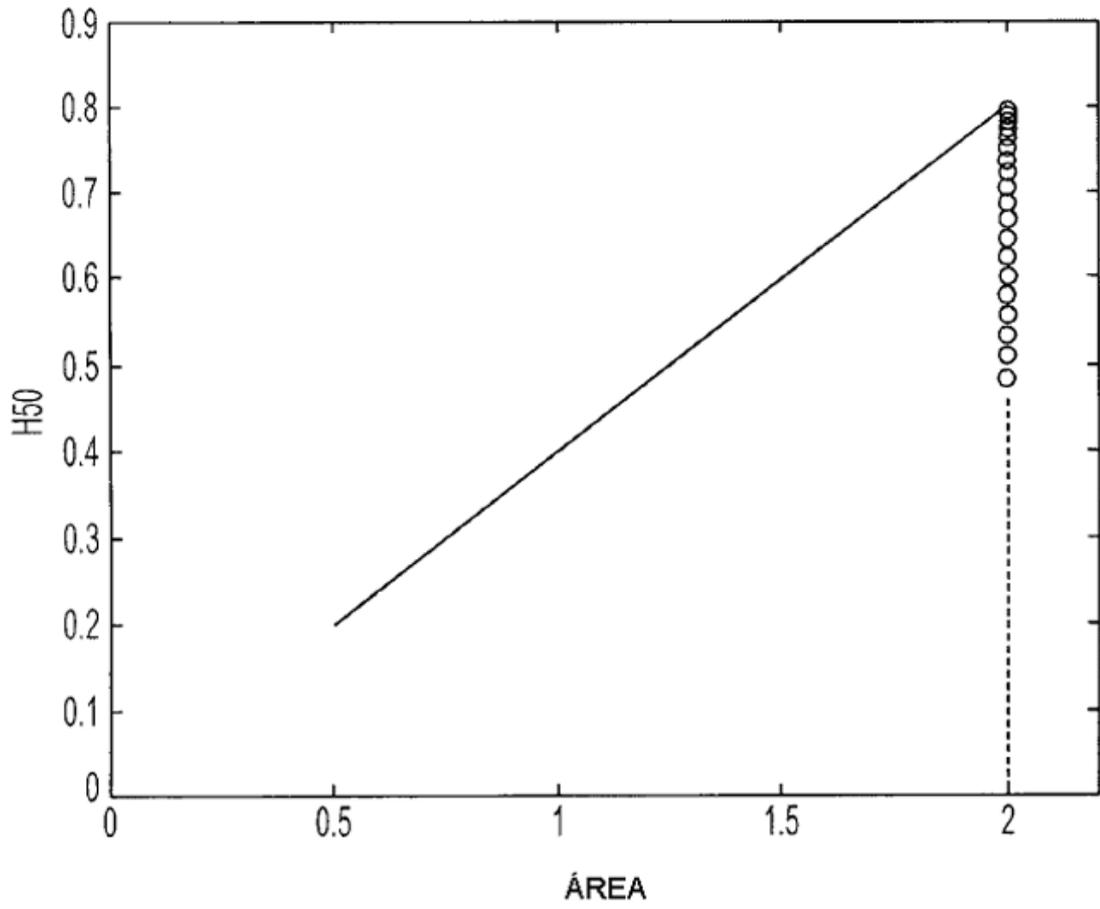


FIG. 11

1200 ↙

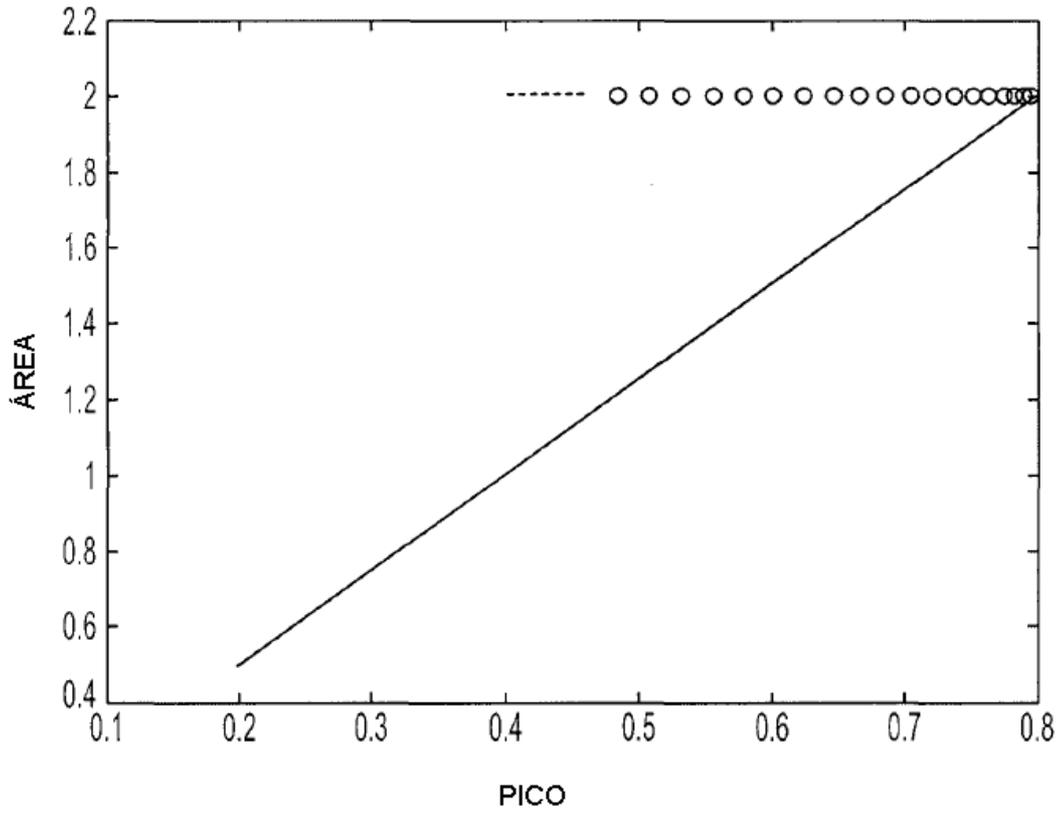


FIG. 12

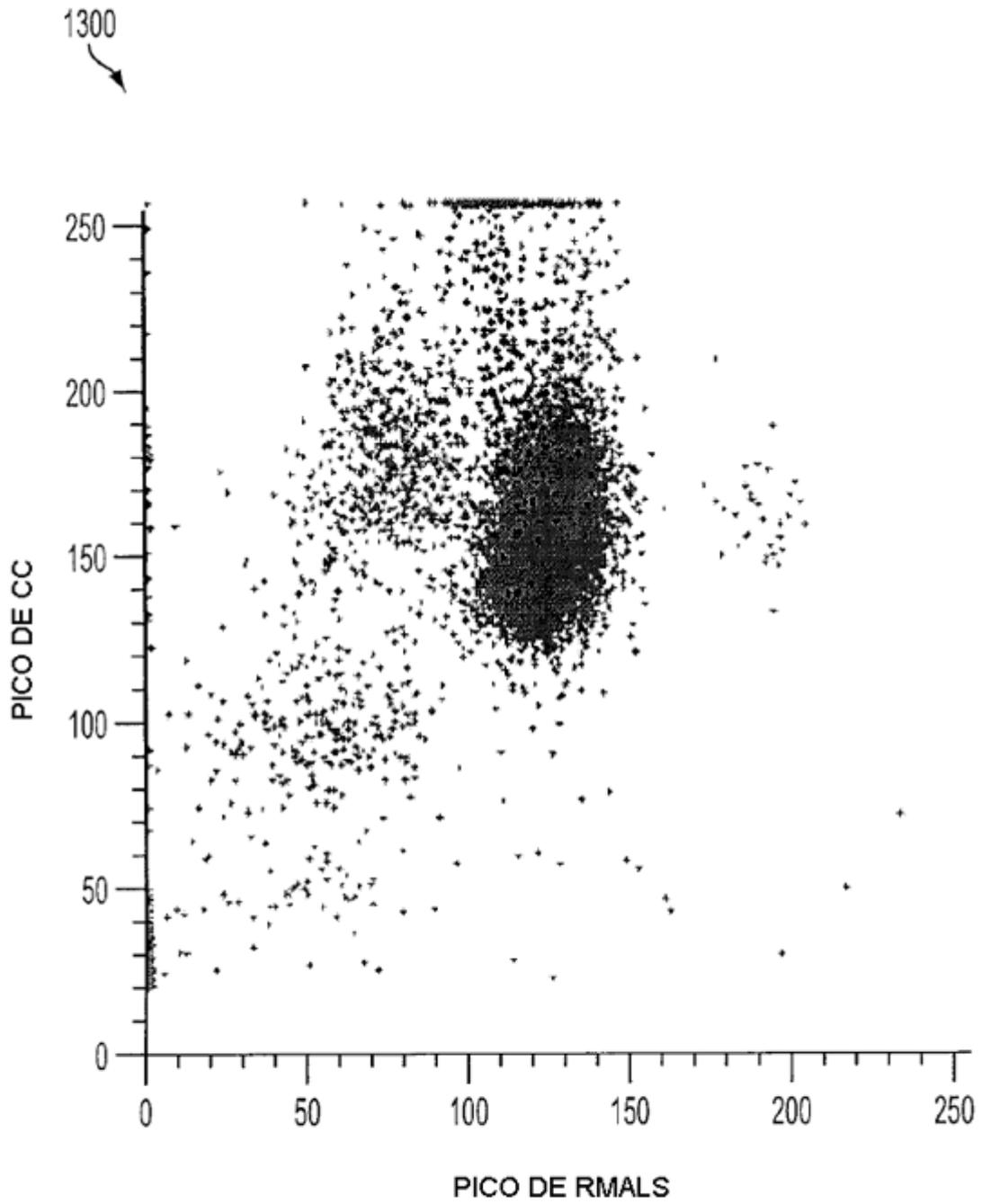


FIG. 13

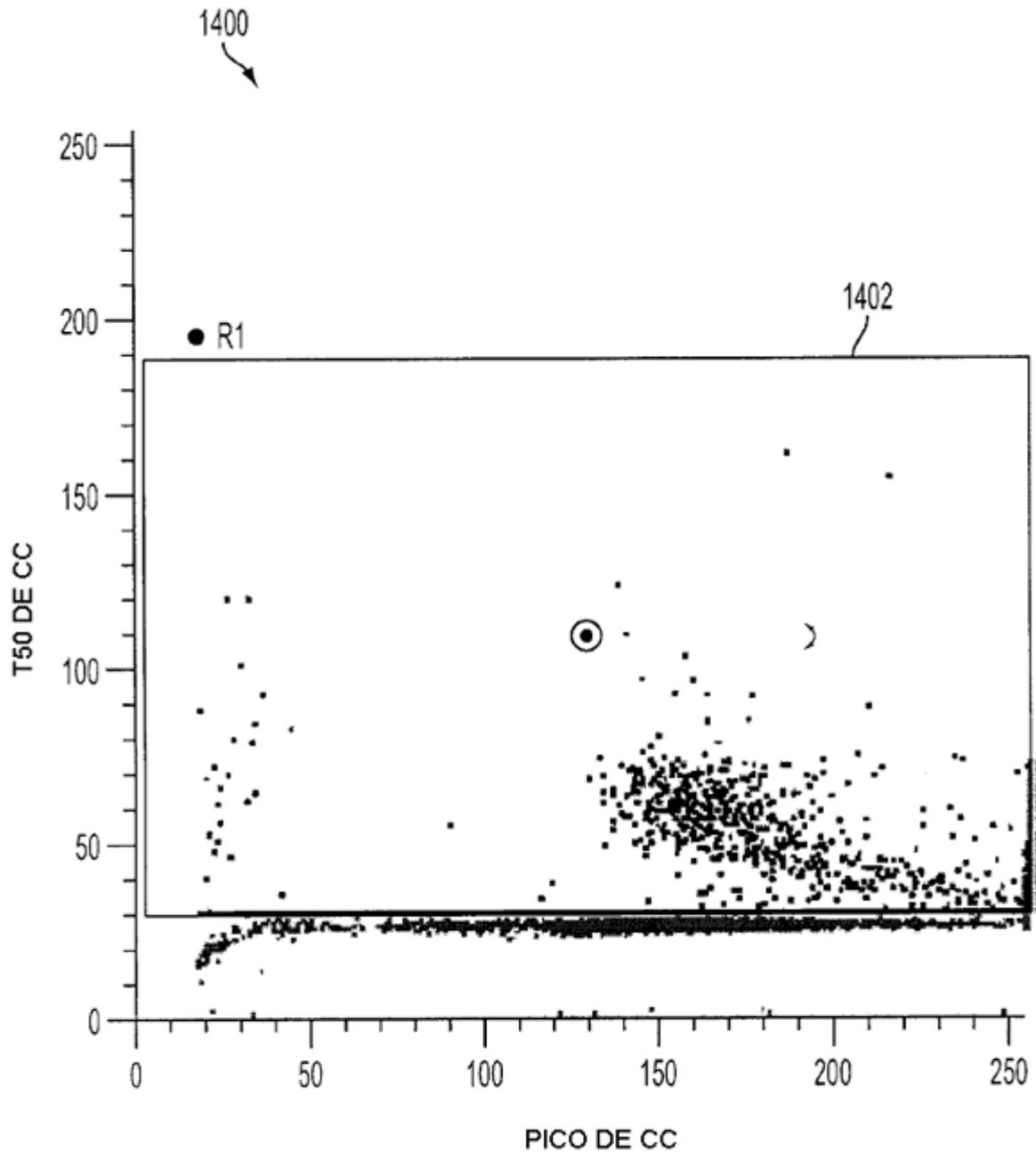


FIG. 14

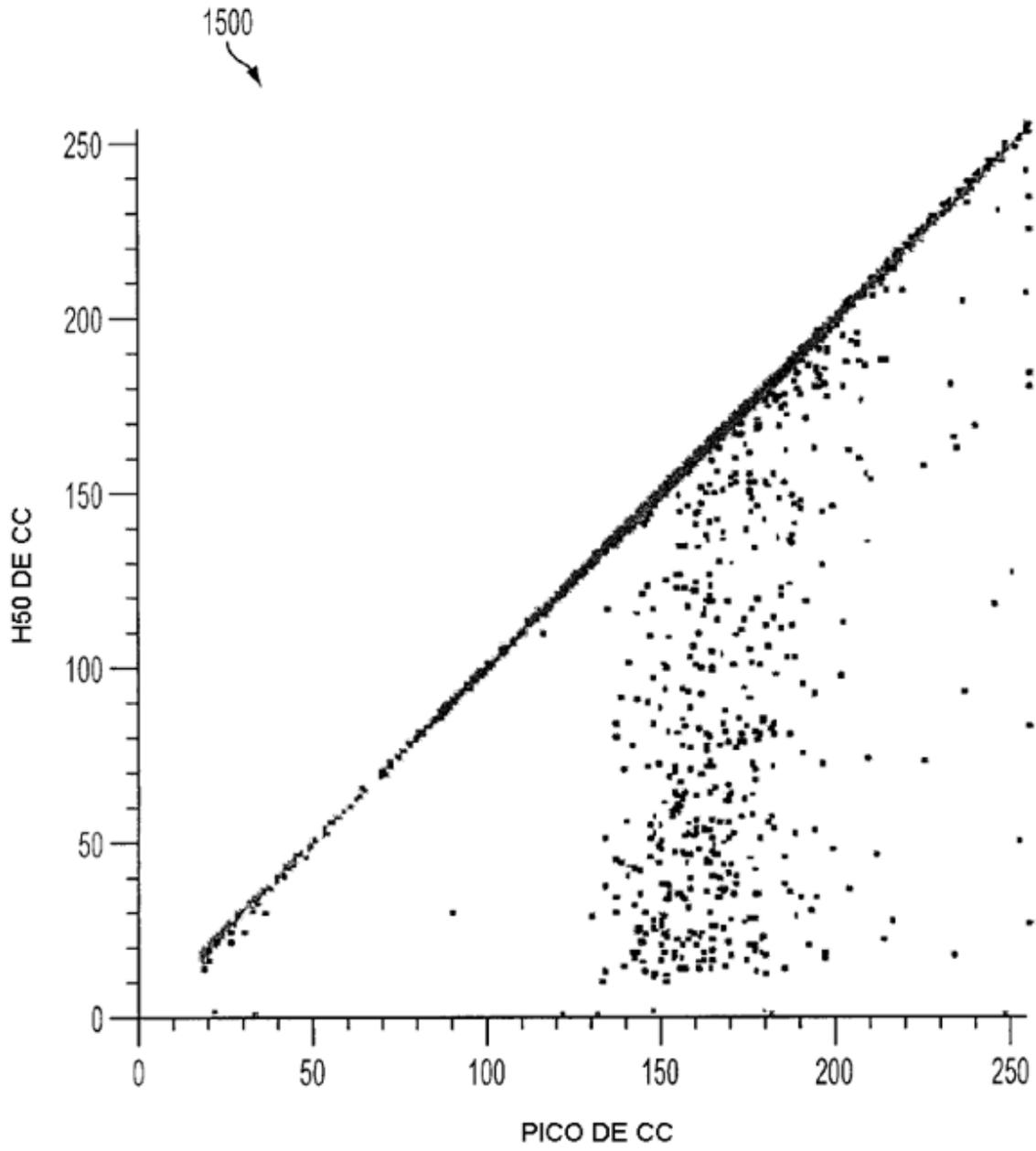


FIG. 15

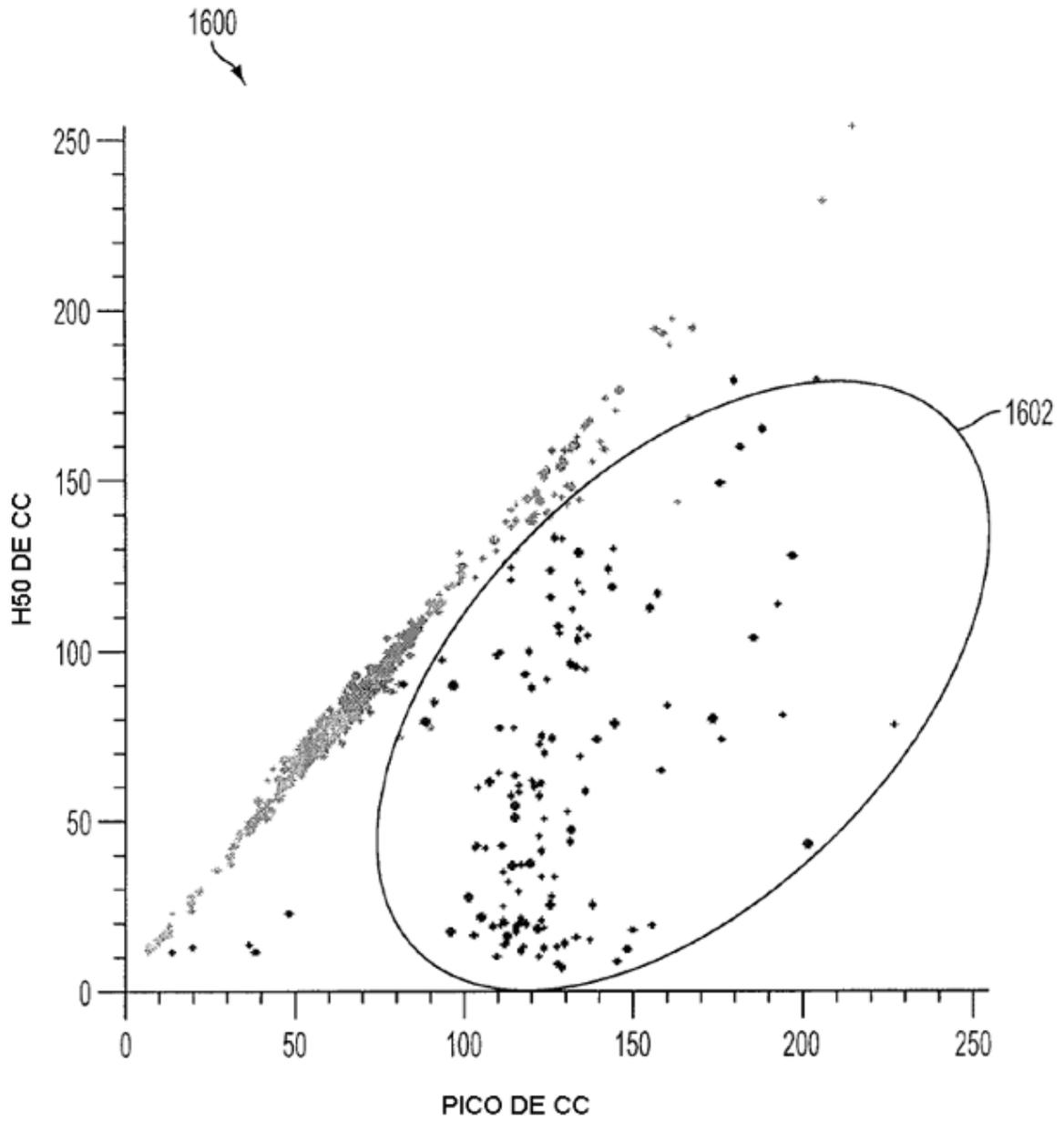


FIG. 16

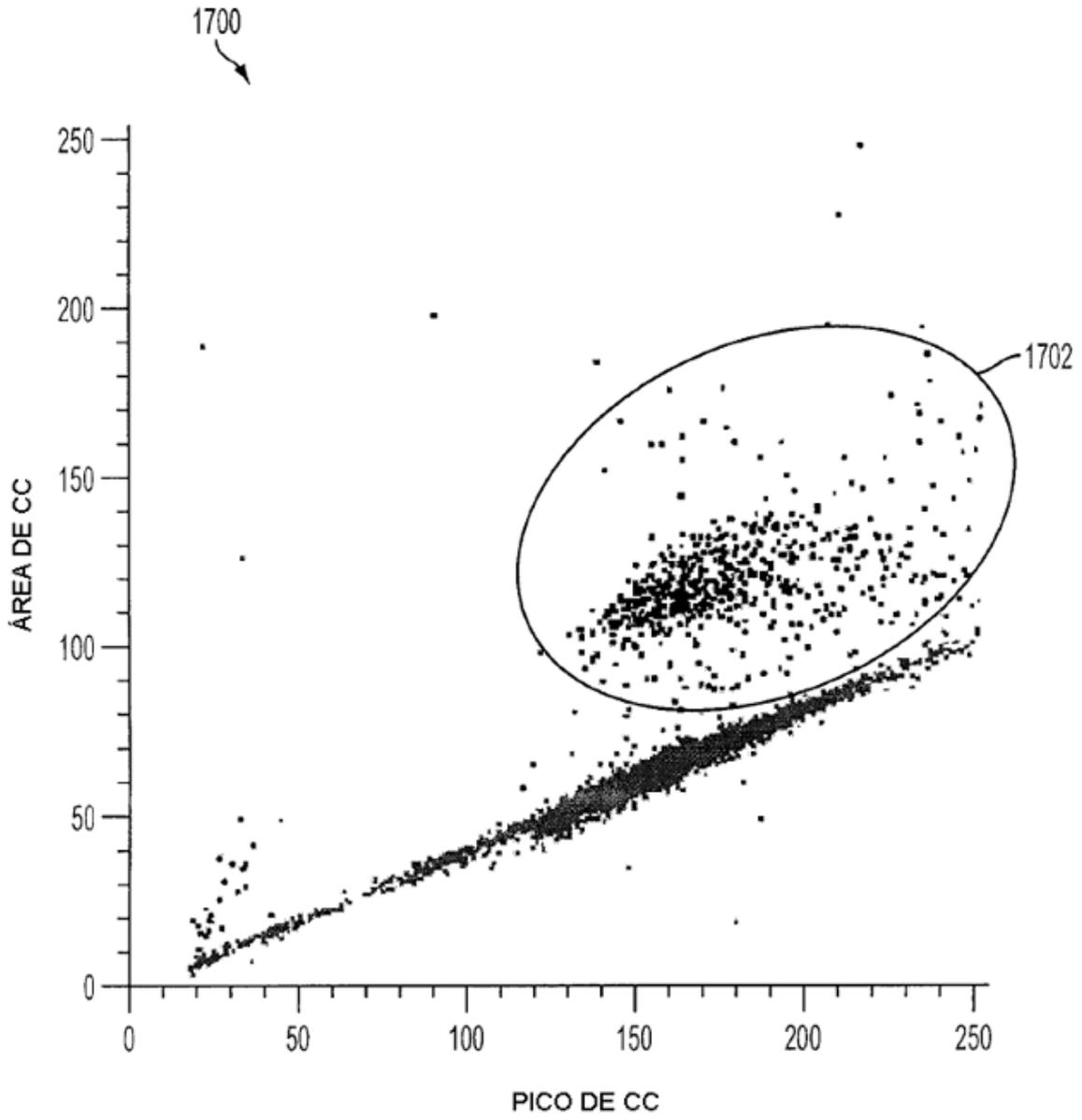


FIG. 17

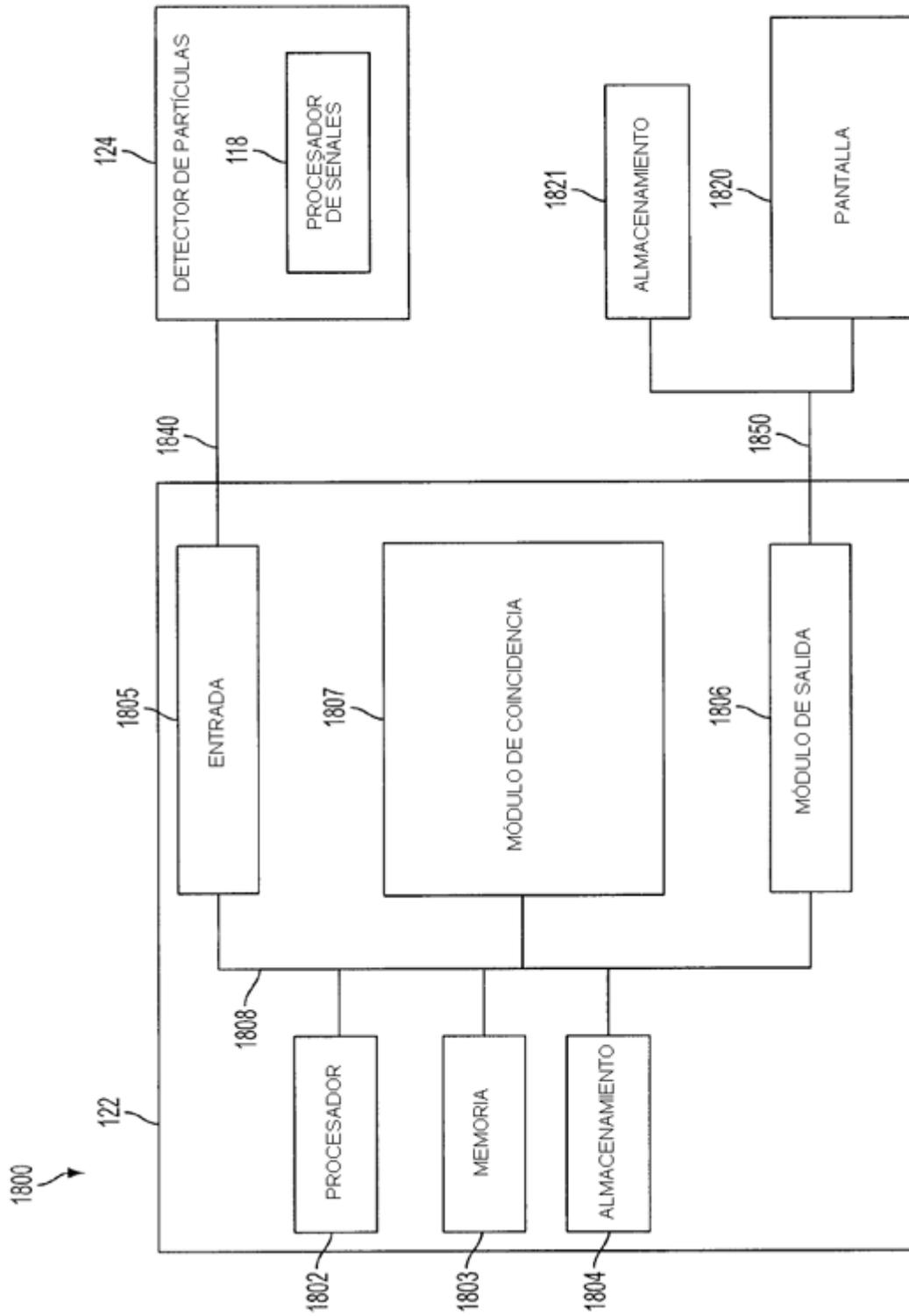


FIG. 18