

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 157**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

G01N 35/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2013 PCT/US2013/025308**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13119924**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2013 E 13706356 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2812671**

54 Título: **Citómetro de clasificación de flujo, método y medios legibles por computadora**

30 Prioridad:

09.02.2012 US 201261597022 P

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

29.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**THRASHER, THOMAS, L.;
BAILEY, BRUCE, G.;
VON SEGGERN, ERIC y
DEGEAL, JEFFREY, W.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 776 157 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

Citómetro de clasificación de flujo, método y medios legibles por computadora

Antecedentes

5 Un citómetro de flujo es útil para identificar las partículas y las características de las partículas contenidas en UN fluido. El fluido normalmente se hace pasar a través de una pequeña boquilla que genera una estrecha corriente de fluido. Un rayo láser ilumina las partículas en la corriente de fluido mientras pasan. Los detectores se colocan para detectar la transmisión y la dispersión de la luz. Esta información se utiliza a continuación por el citómetro de flujo para identificar las características áridas de las partículas en el fluido.

10 Un citómetro de clasificación de flujo utiliza la información sobre las partículas para clasificar las partículas en diferentes contenedores. Para ello, la corriente de fluido se divide en una serie de gotas individuales que contienen una o más de las partículas. A cada gota que contiene una o más partículas a clasificar se le da una carga eléctrica en función de las características de la partícula. Las gotas se hacen pasar a continuación entre placas de desviación con carga opuesta. Las gotas con carga positiva se desplazan hacia la placa con carga negativa, mientras que las gotas con carga negativa se desplazan hacia la placa con carga positiva. Cuanto mayor sea la carga, mayor será el desplazamiento de la gota. Las
15 gotas se clasifican en múltiples contenedores diferentes dispuestos debajo y entre las placas.

20 El documento US 4 347 935 A describe un método mejorado de clasificación de células biológicas en un aparato clasificador de células convencional que incluye la generación de un chorro de fluido que contiene las células a clasificar, midiendo la distancia entre los centros de las gotitas adyacentes en una zona de las mismas definida en el punto en que el chorro de fluido se separa en gotitas discretas, estableciendo la distancia entre el centro de una gota en dicha zona de separación y la posición a lo largo de dicho chorro de fluido en el que la célula es detectada ópticamente para que las características específicas sean un múltiplo integral de dicha distancia de centro a centro, y desactivando un cargador para cargar eléctricamente una gota específica si una célula es detectada por el detector óptico en una posición en donde estará en el área del cuello entre las gotitas durante la formación de la gota en lugar de dentro de una distancia predeterminada del centro de la gota.

25 El documento US 6 589 792 B1 describe un citómetro de flujo capaz de utilizar un sistema de formación de imágenes que incluye un detector para determinar varias propiedades del citómetro de flujo. Lo importante es que la imagen permita determinar el tiempo de retardo de una gota. Otras características que se pueden determinar incluyen, como mínimo, el ancho de la corriente, la presión de la corriente, el efecto de las gotas cargadas sobre otras gotas, la trayectoria de la corriente, la frecuencia de resonancia, las longitudes de onda, el cambio de posición del punto de ruptura de gotas y otras.
30 Se puede utilizar un sistema de alerta automática para alertar a un operador de una anomalía durante la configuración o durante el funcionamiento normal. Además, se puede utilizar un interruptor mecánico para proteger un resultado de clasificación de la contaminación por una corriente de funcionamiento incorrecta. El citómetro también permite la desactivación de la clasificación, en particular los sistemas de carga y desviación. Además, se puede utilizar un sistema más preciso para detectar la velocidad de la corriente. El sistema de formación de imágenes que incluye un detector puede
35 permitir la eliminación del ruido de fondo y la supervisión de un cambio en una característica de la corriente.

El documento US 5 617 911 A describe un método y un aparato para la formación precisa de un artículo tridimensional que comprende proporcionar un suministro de gotas de tamaño, en esencia, uniforme de un material deseado en donde cada gota tiene una carga positiva o negativa.

40 El documento US 2011/177547 A1 describe un dispositivo fluidoico que incluye una disposición de canales para introducir una muestra que contiene partículas de interés en una cámara de procesamiento. La cámara está en comunicación fluida con los canales colectores por medio de canales de conexión de bajo flujo. Las partículas de la muestra se pueden observar y desviar de la cámara de procesamiento mediante la aplicación de una fuerza motriz tal como el atrapamiento óptico en un canal de recolección. Una vez en el canal de recolección, las partículas se pueden recolectar, incluso mediante el atrapamiento en una matriz porosa.

45 El documento US 5 550 058 A describe un método y un aparato para controlar con flexibilidad las decisiones de clasificación de un citómetro de flujo o un instrumento similar en una relación de pureza frente a rendimiento de las partículas clasificadas, particularmente con altas tasas de eventos. El sistema monitoriza las distancias entre los objetos secuenciales para determinar si están lo suficientemente cerca como para estar dentro de una única unidad de resolución del dispositivo de clasificación. El estado de "amigo" o "enemigo" de los eventos vecinos es considerado por este sistema
50 al tratar los eventos "coincidentes" detectados.

Compendio

En términos generales, esta descripción se dirige a un citómetro de clasificación de flujo de acuerdo con la reivindicación 8. El citómetro de clasificación de flujo identifica una secuencia de carga de gotas preasignada no deseable, es decir, una

secuencia de carga de gotas que daría como resultado la fusión de las gotas adyacentes si las cargas de gota se aplicasen a las gotas adyacentes. El citómetro de clasificación de flujo ajusta las cargas a aplicar a las gotas para evitar la formación de la secuencia de carga de gotas no deseada.

5 Un aspecto es un método para operar un citómetro de clasificación de flujo de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el método: identificar, con un dispositivo de cálculo, una secuencia de carga de gotas no deseada asignada a dos o más gotas adyacentes que tienen la posibilidad de ser arrastradas una hacia la otra y fusionarse en una única gota debido a un diferencial de carga total entre como mínimo las dos gotas adyacentes antes de la separación de las gotas de una corriente de fluido; y abortar una operación de clasificación para como mínimo una de las gotas de la secuencia de carga de gotas no deseada en la corriente de fluido para evitar la secuencia de carga de gotas no deseada.

10 Otro aspecto, no cubierto por las reivindicaciones, es un citómetro de clasificación de flujo que comprende: una boquilla de fluido, un láser, un dispositivo de cálculo, electrónica de control de clasificación y placas de desviación. La boquilla de fluido se configura para recibir una entrada de fluido y generar una corriente de fluido a lo largo de una trayectoria de fluido. El láser se configura para generar un rayo láser y colocarlo para dirigir el rayo láser a la corriente de fluido. La electrónica de adquisición, que incluye un analizador detector, se dispone y configura para detectar la luz del láser después de que el
15 rayo láser haya intersecado la corriente de fluido. El dispositivo de cálculo recibe los datos de los eventos de la electrónica de adquisición y genera una decisión preliminar de clasificación asignada a los segmentos de la corriente de fluido; identifica una secuencia de carga de gotas no deseada asignada como mínimo a dos segmentos adyacentes de la corriente de fluido; genera decisiones finales de clasificación modificando las decisiones preliminares de clasificación para abortar una operación de clasificación para uno de los segmentos de fluido como mínimo; y genera una señal de control de clasificación de acuerdo con las decisiones finales de clasificación. La electrónica de control de clasificación recibe la señal de control de clasificación y aplica de forma selectiva cargas a la corriente de fluido. Las placas de desviación se disponen adyacentes a la trayectoria de fluido para clasificar las gotas asociadas a los segmentos de fluido de la corriente de fluido en varios contenedores.

25 Un aspecto adicional es un medio legible por computadora que almacena las instrucciones de programa de acuerdo con la reivindicación 9, en donde las instrucciones de programa, cuando son ejecutadas por un dispositivo de procesamiento dentro de un citómetro de clasificación de flujo, hacen que el dispositivo de procesamiento identifique una secuencia de carga de gotas no deseada asignada a como mínimo dos gotas adyacentes que tienen la posibilidad de ser arrastradas una hacia la otra y fusionarse en una única gota debido a un diferencial de carga total entre como mínimo las dos gotas adyacentes, antes de la separación de las gotas de una corriente de fluido; y abortar una operación de clasificación para como mínimo una de las gotas de la secuencia de carga de gotas no deseada en la corriente de fluido para evitar la
30 secuencia de carga de gotas no deseada.

Otro aspecto, no cubierto por las reivindicaciones, es un método de funcionamiento de un citómetro de clasificación de flujo, comprendiendo el método: caracterizar las partículas asociadas con una primera gota y una segunda gota a lo largo de una trayectoria de fluido; preasignar una carga a la primera gota y la segunda gota en función de la caracterización de una o más partículas asociadas con cada gota; y no aplicar de forma selectiva la carga preasignada a una de la primera
35 gota y la segunda gota en función, al menos en parte, de la magnitud de la carga preasignada de la primera gota y la segunda gota.

40 Un aspecto adicional, no cubierto por las reivindicaciones, es un método de funcionamiento de un citómetro de clasificación de flujo, comprendiendo el método: caracterizar una primera partícula y una segunda partícula en una corriente de fluido; asignar una carga preliminar a la primera partícula y la segunda partícula en función de la caracterización de la primera partícula y la segunda partícula, respectivamente; asignar cargas finales a la primera partícula y la segunda partícula en función de las cargas preliminares asignadas a la primera partícula y la segunda partícula; y clasificar la primera partícula y la segunda partícula en función de las cargas finales asignadas.

45 Todavía otro aspecto, no cubierto por las reivindicaciones, es un método de funcionamiento de un citómetro de clasificación de flujo, comprendiendo el método: a) caracterizar una primera partícula; b) asignar un valor de desviación a la primera partícula; c) caracterizar una segunda partícula; d) asignar un valor de desviación a la segunda partícula; e) cambiar el valor de desviación asignado de una de la primera partícula y la segunda partícula si el valor de desviación de la primera partícula excede un valor de desviación máximo y el valor de desviación de la segunda partícula excede un valor de desviación máximo opuesto; y f) clasificar la primera partícula y la segunda partícula en función de los valores de desviación
50 asignados.

Otro aspecto, no cubierto por las reivindicaciones, es un método de funcionamiento de un citómetro de clasificación de flujo, comprendiendo el método: a) caracterizar una primera partícula; b) asignar una carga y una prioridad a la primera partícula; c) caracterizar una segunda partícula; d) asignar una carga y una prioridad a la segunda partícula; e) cambiar la carga asignada a una de la primera partícula y la segunda partícula que tenga la prioridad asignada más baja, en donde
55 el cambio es función de las cargas asignadas a la primera partícula y la segunda partícula; y f) clasificar la primera partícula y la segunda partícula en función de las cargas asignadas a la primera partícula y la segunda partícula después de la operación (e).

Un aspecto adicional, no cubierto por las reivindicaciones, es un método de funcionamiento de un citómetro de clasificación de flujo, comprendiendo el método: caracterizar las partículas asociadas a tres gotas consecutivas de la corriente de fluido, incluyendo las tres gotas consecutivas una gota intermedia entre una primera gota y una tercera gota; preasignar una carga a cada una de las tres gotas consecutivas en función de la caracterización de la partícula asociada a cada gota; y asignar a como mínimo una de las tres gotas consecutivas una carga que sea diferente de la carga preasignada correspondiente si la carga preasignada de la gota intermedia es mayor que un valor máximo predeterminado y la carga preasignada de la primera gota o la tercera gota es mayor que un valor máximo predeterminado opuesto.

Otro aspecto, no cubierto por las reivindicaciones, es un sistema de citómetro de clasificación de flujo que comprende una campana de contaminantes y un citómetro de clasificación de flujo. El citómetro de clasificación de flujo comprende: una boquilla de fluido, un láser, un dispositivo de cálculo, electrónica de control de clasificación y placas de desviación. La boquilla de fluido se configura para recibir una entrada de fluido y generar una corriente de fluido a lo largo de una trayectoria de fluido. El láser se configura para generar un rayo láser y colocarlo para dirigir el rayo láser a la corriente de fluido. La electrónica de adquisición incluye un analizador detector dispuesto adyacente al rayo de fluido para detectar la luz del láser después de que el rayo láser haya intersecado la corriente de fluido. El dispositivo de cálculo recibe los datos de los eventos de la electrónica de adquisición y genera una decisión preliminar de clasificación asignada a los segmentos de la corriente de fluido; identifica una secuencia de carga de gotas no deseada asignada a como mínimo dos segmentos adyacentes de la corriente de fluido; genera decisiones finales de clasificación modificando las decisiones preliminares de clasificación para abortar una operación de clasificación para como mínimo uno de los segmentos de fluido; y genera una señal de control de clasificación de acuerdo con las decisiones finales de clasificación. La electrónica de control de clasificación recibe la señal de control de clasificación y aplica de forma selectiva cargas a la corriente de fluido. Las placas de desviación se disponen adyacentes a la trayectoria de fluido para clasificar las gotas asociadas a los segmentos de fluido de la corriente de fluido en varios contenedores.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista en perspectiva de un sistema de citómetro de clasificación de flujo de ejemplo que incluye un citómetro de flujo.

La FIG. 2 es un diagrama de bloques esquemático del citómetro de clasificación de flujo de ejemplo mostrado en la FIG. 1.

La FIG. 3 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra aspectos adicionales del citómetro de clasificación de flujo mostrado en la FIG. 2.

La FIG. 4 ilustra una arquitectura de ejemplo de un dispositivo de cálculo que se puede utilizar para implementar aspectos del citómetro de clasificación de flujo.

La FIG. 5 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra un método no deseable de funcionamiento del citómetro de clasificación de flujo.

La FIG. 6 es un diagrama de flujo que ilustra un método de funcionamiento del citómetro de flujo para evitar el funcionamiento no deseable mostrado en la FIG. 5.

La FIG. 7 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra un método deseable de funcionamiento del citómetro de clasificación de flujo.

La FIG. 8 ilustra un método de ejemplo para identificar una secuencia de carga de gotas no deseada.

La FIG. 9 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra una memoria intermedia de ejemplo que contiene decisiones preliminares de clasificación.

La FIG. 10 ilustra un método de identificación de ejemplo de una o más gotas para las cuales se debe abortar la clasificación, después de identificar una secuencia de carga de gotas no deseada.

La FIG. 11 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra otro ejemplo de memoria intermedia, que incluye datos de prioridad de gotas.

La FIG. 12 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra una memoria intermedia de ejemplo que almacena las decisiones finales de clasificación.

Descripción detallada

Se describirán varias formas de realización en detalle con referencia a los dibujos, en donde los mismos números de referencia representan las mismas partes y conjuntos a lo largo de las diversas vistas. La referencia a diversas formas de

realización no limita el alcance de las reivindicaciones adjuntas a la presente memoria. Además, algunos ejemplos expuestos en esta memoria descriptiva no pretenden ser limitativos y se limitan a exponer algunas de las muchas posibles formas de realización para las reivindicaciones adjuntas.

5 Cuando se realiza una operación de clasificación con un citómetro de clasificación de flujo, existe la posibilidad de que, antes de la clasificación, dos gotas adyacentes puedan tener un diferencial de carga lo suficientemente grande como para que se atraigan entre sí y se fusionen en una única gota. La gota resultante tiene una carga neta que es la suma de las dos cargas individuales, que es suficientemente diferente de cualquiera de las cargas individuales, y da como resultado la clasificación de la gota en un lugar no deseado.

10 La presente descripción describe un enfoque para resolver los problemas de la mala clasificación de las partículas y la contaminación de las mismas durante el funcionamiento de un citómetro de clasificación de flujo, reduciendo o eliminando la posibilidad de que dos gotas con carga opuesta se fusionen en una única gota antes de la clasificación.

La FIG. 1 es una vista en perspectiva de un sistema de citómetro de clasificación de flujo 100 de ejemplo. En este ejemplo, el sistema de citómetro de clasificación de flujo 100 incluye una campana de contención 102 y un citómetro de clasificación de flujo 104. El citómetro de clasificación de flujo 104 también incluye una pantalla 106 en algunas formas de realización.

15 En algunas formas de realización, el citómetro de clasificación de flujo 104 se dispone dentro de una campana de contención 102. La campana de contención funciona normalmente para contener las partículas que pueden estar dentro de una muestra de una región predeterminada, manteniendo un flujo de aire laminar dentro de la campana de contención 102. Por ejemplo, si la muestra contiene partículas biológicas, la campana de contención 102 funciona para contener las partículas en el espacio dentro de la campana de contención 102, y hacia fuera a través de una trayectoria de escape controlada. En algunas formas de realización se utilizan filtros para eliminar las partículas del aire en la trayectoria de escape. Un ejemplo de una campana de contención adecuada es el armario de seguridad biológica SterilGARD®III 503a Advance, Class II, Type A2 con flujo vertical disponible de la empresa Baker en Sanford, Maine. Las dimensiones del armario se pueden ampliar o contraer según sea necesario para encerrar adecuadamente el citómetro de clasificación de flujo 104 en el mismo.

20 El citómetro de clasificación de flujo 104 es un dispositivo configurado para evaluar el contenido de un fluido y clasificar el contenido en múltiples contenedores diferentes, en función de las características detectadas. (Un ejemplo del citómetro de clasificación de flujo se ilustra en la FIG. 2.)

25 En algunas formas de realización, el citómetro de clasificación de flujo 104 descrito en la presente memoria puede clasificar el contenido de un fluido con una pureza excepcional (por ejemplo, superior del 99%), a saber, asegurando que las gotas seleccionadas para la clasificación se dirijan adecuadamente a los recipientes adecuados.

30 En algunas formas de realización, una pantalla 106 del citómetro de clasificación de flujo 104 se monta fuera de la campana de contención 102. En este ejemplo, un soporte se sujeta a un lado de la campana de contención 102. Un brazo articulado se monta en el soporte, que funciona para soportar la pantalla 106. El brazo articulado gira en una o más dimensiones para permitir que el operador recolocque la pantalla 106 en una ubicación deseada.

35 Aunque el citómetro de clasificación de flujo 104 se muestra colocado dentro de la campana de contención 102, algunas formas de realización no incluyen una campana de contención 102.

40 La FIG. 2 es un diagrama de bloques esquemático de un citómetro de clasificación de flujo 104 de ejemplo. En este ejemplo, el citómetro de clasificación de flujo 104 incluye una boquilla de fluido 110, un láser 112, la electrónica de adquisición 114 (que incluye un analizador detector 116), un dispositivo de cálculo 118, la electrónica de control de clasificación 120, un oscilador 122, placas de desviación 124A, 124B y contenedores 126. Las características adicionales ilustradas en la FIG. 2 incluyen una entrada de fluido 128, una corriente de fluido 130, un punto de iluminación láser 132, un punto de ruptura de gotas 134, gotas 136, y fluidos clasificados 138.

45 La entrada de fluido se proporciona a la boquilla de fluido 110, que genera una estrecha corriente de fluido 130 a lo largo de una trayectoria de fluido 131. El ancho de la corriente de fluido 130 es aproximadamente el mismo que el ancho del puerto de salida de la boquilla de fluido. En algunas formas de realización, la boquilla de fluido 110 es desmontable y se puede reemplazar por otras boquillas con puertos de salida de diferente tamaño. Por ejemplo, los puertos de salida pueden estar en un rango desde unos 50 micrómetros hasta unos 200 micrómetros, y en algunas formas de realización entre unos 70 y unos 100 micrómetros.

50 El láser 112 genera un rayo láser que se dirige a la corriente de fluido 130, para iluminar la corriente de fluido 130 en el punto de iluminación del láser 132.

La electrónica de adquisición 114, tal como la que incluye un analizador detector 116, funciona para detectar partículas en la corriente de fluido 130 e identificar las características de las partículas. En algunas formas de realización, el analizador detector 116 detecta la dispersión de la luz (incluida la dispersión hacia adelante y la dispersión lateral) y la fluorescencia,

y utiliza esta información para identificar la presencia de partículas en la corriente de fluido e identificar las características de las partículas. Cuando se detecta una partícula, se generan datos de eventos (según se muestra en la FIG. 3) que se proporcionan al dispositivo de cálculo 118.

5 Aunque en el analizador detector 116 se puede colocar físicamente adyacente a la corriente de fluido 130, otra posible forma de realización incluye uno o más dispositivos de transmisión de luz, tales como la fibra óptica, para transmitir la luz a los detectores colocados lejos de la corriente de fluido 130.

El dispositivo de cálculo 118 recibe los datos del evento y genera una señal de control de clasificación en función de los datos en bruto, según se ilustra en la FIG. 3.

10 El dispositivo de cálculo 118 puede ser uno o más dispositivos de cálculo, y cada uno de los dispositivos de cálculo puede incluir uno o más dispositivos de procesamiento.

Múltiples dispositivos de cálculo pueden estar en comunicación de datos a través de un bus de comunicación o una red de comunicación de datos, por ejemplo. El uno o más dispositivos de cálculo se denominan en la presente memoria como "el dispositivo de cálculo". Un ejemplo de un dispositivo de cálculo 118 adecuado se ilustra y describe con más detalle en la presente memoria con referencia a la FIG. 4.

15 La electrónica de control de clasificación 120 recibe las señales de control de clasificación del dispositivo de cálculo 118 y aplica las cargas apropiadas a la corriente de fluido 130 en función de las señales de control de clasificación.

El oscilador 122 genera una vibración a una frecuencia deseada, que hace vibrar la corriente de fluido 130. Las vibraciones en la corriente de fluido 130 hacen que las gotas 136 se separen de la corriente de fluido 130 a intervalos regulares. A continuación, las gotas 136 continúan a lo largo de la trayectoria de fluido 131.

20 Cuando las señales de control de clasificación indican que una gota debe ser clasificada, la electrónica de control de clasificación 120 aplica un voltaje apropiado a la corriente de fluido justo antes de que la gota 136 se separe de la corriente de fluido en el punto de ruptura de gotas 134. El voltaje crea una transformación física de la corriente de fluido añadiendo o quitando electrones de la corriente de fluido, que es tanto medible como detectable en la corriente de fluido, y la gota 136 formada posteriormente. Cuando la gota 136 se separa, la carga aplicada a la corriente de fluido permanece en la gota. La electrónica de control de clasificación puede entonces aplicar una carga apropiada a la corriente de fluido 130 para la siguiente gota, en función de las señales de control de clasificación. Si el dispositivo de cálculo determina que el fluido para una determinada gota no necesita ser clasificado, la electrónica de control de clasificación 120 no aplica una carga a la corriente de fluido antes de que la gota alcance el punto de ruptura 134.

30 Las gotas 136 pasan a continuación entre las placas de desviación cargadas 124A, 124B. Cada una de las placas está conectada eléctricamente a fuentes de voltaje de polaridades opuestas (por ejemplo, +/- 4000 V). Las fuentes de voltaje suministran cargas opuestas de cada una de las placas de desviación 124A, 124B, lo que genera un campo eléctrico entre las placas de desviación 124A, 124B.

35 Cuando las gotas 136 pasan entre las placas de desviación 124A, 124B, las gotas 136 que han recibido una carga son atraídas hacia la placa de desviación 124A, 124B que tiene la polaridad opuesta. Por ejemplo, una gota 136 cargada positivamente es atraída hacia la placa de desviación 124B cargada negativamente, mientras que una gota 136 cargada negativamente es atraída hacia la placa de desviación 124A cargada positivamente. Las gotas 136 para las que no se aplica una carga, pasan directamente sin desviarse.

40 Además de desviar las gotas hacia un lado u otro, la magnitud de la carga aplicada a una gota se puede variar mediante la electrónica de control de clasificación 120 para ajustar el grado de desplazamiento. Cuanto mayor sea la magnitud de la carga aplicada a una gota 136, mayor será el desplazamiento de la gota 136 hacia la placa de desviación, 124A, 124B cargada al contrario. Como resultado, las gotas 136 se pueden clasificar en múltiples contenedores diferentes 126, donde se recogen para su uso posterior.

45 En este ejemplo, el citómetro de clasificación de flujo 104 incluye seis contenedores 126, (sin incluir una trayectoria central de desechos o un contenedor para gotas no clasificadas). Un citómetro de clasificación de flujo 104 que tiene seis contenedores se puede denominar como un citómetro de clasificación de flujo de seis vías. Otras formas de realización pueden incluir otras cantidades de contenedores 126, tal como dos, cuatro, seis, ocho o más.

50 La FIG. 3 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra aspectos adicionales del citómetro de clasificación de flujo 104, mostrado en la FIG. 2. En este ejemplo, el citómetro de clasificación de flujo 104 incluye la electrónica de adquisición 114, el dispositivo de cálculo 118, la electrónica de control de clasificación 120. El dispositivo de cálculo incluye el motor de cálculo de parámetros de eventos 160, el motor de decisión de clasificación 162, y el almacenamiento de eventos y estados 164. La electrónica de adquisición 114 proporciona datos de eventos 152 al dispositivo de cálculo 118, y el dispositivo de cálculo 118 proporciona una señal de control de clasificación 154 a la electrónica de control de clasificación 120.

La electrónica de adquisición 114 recibe la luz del láser 112 (según se muestra en la FIG. 2) después de pasar por la corriente de fluido 130 en el punto de iluminación del láser, y evalúa la luz para detectar partículas en la corriente de fluido 130 e identificar las características de las partículas. La electrónica de adquisición 114 genera los datos de eventos 152 y suministra los datos de eventos 152 al dispositivo de cálculo 118.

5 El dispositivo de cálculo 118 incluye un motor de cálculo de parámetros de eventos 160, un motor de decisión de clasificación 162, y un almacenamiento de eventos y estados 164.

El motor de cálculo de parámetros de eventos 160 recibe los datos de eventos 152 de la electrónica de adquisición 114. En algunas formas de realización, el motor de cálculo de parámetros de eventos 160 también recibe definiciones lógicas de clasificación de un usuario, o recupera las definiciones de un dispositivo de almacenamiento legible por computadora.

10 Las definiciones lógicas de clasificación contienen una ecuación arbitraria definida por el usuario de los cálculos intermedios y las ecuaciones lógicas de clasificación finales deseadas para clasificar las partículas que se encuentran en la corriente de fluido. El motor de cálculo de parámetros de eventos 160 calcula los valores de los parámetros de la definición de la lógica de clasificación que se calculan en función de los datos de eventos 152. Los parámetros calculados pueden ser función de los datos de eventos 152 enviados por la electrónica de adquisición 114, de valores constantes introducidos por el usuario o almacenados como estándares en un dispositivo de almacenamiento legible por computadora, y/o de otros valores calculados.

Una vez que el motor de cálculo de parámetros de eventos 160 calcula todos los valores de los parámetros calculados, los datos de los eventos 152 y los parámetros calculados para cada evento se envían al motor de decisión de clasificación 162. El motor de decisión de clasificación 162 conecta los datos de los eventos y los valores de los parámetros calculados en las definiciones lógicas de clasificación, por ejemplo. En algunas formas de realización, las definiciones lógicas de clasificación contienen una definición lógica, por ejemplo, una definición de lógica booleana, que identifica la clasificación deseada de las partículas.

El motor de decisión de clasificación 162 evalúa las definiciones lógicas de clasificación, aborda las ambigüedades de clasificación seleccionando un único contenedor 126 (mostrado en la FIG. 2) para recibir cada evento encontrado (tal como cuando dentro de la gota hay contenidas múltiples partículas, que preferiblemente se clasificarían en diferentes contenedores), toma decisiones de clasificación y crea la señal de control de clasificación 154 en función de las decisiones de clasificación. En algunas formas de realización, el motor de decisión de clasificación 162 genera primero una decisión de clasificación preliminar en función del contenido identificado de una gota. La decisión preliminar de clasificación identifica el contenedor 126 al que se debe asignar la gota en función, al menos en parte, de las definiciones lógicas de clasificación.

La decisión de clasificación preliminar comprende una carga eléctrica preliminar asignada a la gota para dirigir la gota al contenedor 126 identificado. La carga eléctrica asignada a la gota puede ser positiva, negativa o neutra, donde una carga neutra es una carga que hace que la gota se desplace sin ser detectada a lo largo de la trayectoria de fluido 131 al pasar entre las placas de desviación cargadas 124A, 124B, de tal manera que, por ejemplo, se dirija hacia el contenedor colocado centralmente.

La preasignación de una carga implica asignar la carga en una decisión de clasificación preliminar a una parte de la corriente de fluido que se prevé que posteriormente formará una gota individual. La decisión preliminar de clasificación se toma antes de generar una decisión final de clasificación, en la que la magnitud de la carga puede ser diferente en la decisión final de clasificación para evitar un diferencial de carga de gotas relativamente alto.

40 Una vez generada la decisión de clasificación preliminar, la decisión de clasificación preliminar se almacena en una cola. La decisión preliminar de clasificación se compara entonces con otras decisiones de clasificación adyacentes, para identificar cualquier secuencia de carga de gotas no deseada, a saber, dos gotas adyacentes que tengan un diferencial de carga de gotas relativamente alto. Si se identifica una secuencia de carga de gotas no deseada, la decisión preliminar de clasificación se modifica para abortar la clasificación de una o más de las gotas, según se describe con más detalle con referencia a la FIG. 10. Las decisiones finales de clasificación comprenden las cargas eléctricas finales asignadas a las gotas, que se almacenan en una memoria intermedia y se utilizan para generar y enviar la señal de control de clasificación 154 a la electrónica de control de clasificación 120.

El motor de decisión de clasificación también registra las decisiones de clasificación en el almacenamiento de eventos y estados 164. El almacenamiento de eventos y estados 164 es, por ejemplo, un dispositivo de almacenamiento legible por computadora, tal como los descritos en la presente memoria. El almacenamiento de eventos y estados 164 almacena datos sobre las partículas identificadas en la corriente de fluido 130 y las decisiones de clasificación que se tomaron, por ejemplo.

La electrónica de control de clasificación 120 recibe la señal de control de clasificación 154 del motor de decisión de clasificación 162 y funciona junto con la boquilla de fluido 110 y el oscilador 122 (mostrado en la FIG. 2) para aplicar las cargas apropiadas a las gotas 136 que contienen una partícula de interés, para clasificar las gotas y las partículas

asociadas en los contenedores apropiados 126.

5 Detalles adicionales de un citómetro de flujo de ejemplo se describen con más detalle en la publicación de EE.UU. N.º 2008/0255705, presentada el 16 de octubre de 2008 y titulada "FLOW CYTOMETER SORTER". Por ejemplo, esta publicación proporciona detalles adicionales sobre la electrónica de adquisición 114 adecuada (denominada en la publicación "electrónica de adquisición 108"), la electrónica de control de clasificación 120 (denominada como "electrónica de control de clasificación 114"), el motor de cálculo de parámetros de eventos 160 (denominado como "módulo de cálculo de parámetros para la toma de decisiones de clasificación 112"), y el almacenamiento de eventos y estados 164 (denominado como "almacenamiento de eventos y estados 126"), así como determinados aspectos del motor de decisión de clasificación 162 (denominado como "módulo de decisión de clasificación 116") y otros aspectos de un citómetro de flujo de ejemplo.

10 La FIG. 4 ilustra una arquitectura de ejemplo de un dispositivo de cálculo que se puede utilizar para implementar aspectos de la presente descripción, incluyendo cualquiera de los uno o más dispositivos de cálculo 118 que se pueden utilizar dentro del citómetro de clasificación de flujo 104. El dispositivo de cálculo ilustrado en la FIG. 4 se puede utilizar para ejecutar, con el dispositivo de procesamiento 180, el sistema operativo, los programas de aplicación y los módulos de software (que incluyen los motores de software) descritos en la presente memoria.

15 El dispositivo de cálculo 118 incluye, en algunas formas de realización, como mínimo un dispositivo de procesamiento 180, tal como una unidad central de procesamiento (CPU). Existen diversos dispositivos de procesamiento disponibles de diversos fabricantes, por ejemplo, Intel o Advanced Micro Devices. En este ejemplo, el dispositivo de cálculo 118 también incluye una memoria de sistema 182, y un bus de sistema 184 que acopla varios componentes del sistema, incluida la memoria de sistema 182, al dispositivo de procesamiento 180. El bus de sistema 184 es uno de los muchos tipos de estructuras de bus que incluyen un bus de memoria, o controlador de memoria; un bus periférico; y un bus local que utiliza cualquiera de las diversas arquitecturas de bus.

20 Entre los ejemplos de dispositivos de cálculo adecuados para el dispositivo de cálculo 118 se incluyen un ordenador de escritorio, un ordenador portátil, un ordenador tipo tableta, un dispositivo de cálculo móvil (tal como un teléfono inteligente, un dispositivo digital móvil iPod® o iPad® u otros dispositivos móviles) u otros dispositivos configurados para procesar instrucciones digitales.

25 La memoria de sistema 182 incluye la memoria de sólo lectura 186 y la memoria de acceso aleatorio 188. Un sistema básico de entrada/salida 190 que contiene las rutinas básicas que actúan para transferir la información dentro del dispositivo de cálculo 118, tal como por ejemplo durante el arranque, se almacena normalmente en la memoria de sólo lectura 186.

30 El dispositivo de cálculo 118 también incluye un dispositivo de almacenamiento secundario 192 en algunas formas de realización, tal como una unidad de disco duro, para almacenar datos digitales. El dispositivo de almacenamiento secundario 192 se conecta al bus de sistema 184 mediante una interfaz de almacenamiento secundario 194. Los dispositivos de almacenamiento secundario 192 y sus medios legibles por computadora asociados proporcionan almacenamiento no volátil de instrucciones legibles por computadora (que incluyen programas de aplicación y módulos de programa), estructuras de datos y otros datos para el dispositivo de cálculo 118.

35 Aunque el entorno de ejemplo descrito en la presente memoria emplea un disco duro como dispositivo de almacenamiento secundario, en otras formas de realización se utilizan otros tipos de medios de almacenamiento legibles por computadora. Entre los ejemplos de estos otros tipos de medios de almacenamiento legibles por computadora figuran los casetes magnéticos, las tarjetas de memoria flash, los discos de vídeo digitales, los cartuchos Bernoulli, las memorias de sólo lectura de discos compactos, las memorias de sólo lectura de discos versátiles digitales, las memorias de acceso aleatorio o las memorias de sólo lectura. Algunas formas de realización incluyen medios no transitorios.

40 En el dispositivo de almacenamiento secundario 192 o en la memoria 182 se pueden almacenar varios módulos de programa, que incluyen un sistema operativo 196, uno o más programas de aplicación 198, otros módulos de programa 200 (tales como los motores de software descritos en la presente memoria, que incluyen el motor de cálculo de parámetros de eventos 160 y el motor de decisión de clasificación 162), y datos de programa 202. El dispositivo de cálculo 118 puede utilizar cualquier sistema operativo adecuado, tal como Microsoft Windows™, Google Chrome™, Apple OS, y cualquier otro sistema operativo adecuado para un dispositivo de cálculo. Otros ejemplos pueden incluir los sistemas operativos de Microsoft, Google o Apple, o cualquier otro sistema operativo adecuado utilizado en los dispositivos de cálculo tipo tableta.

45 En algunas formas de realización, un usuario proporciona entradas al citómetro de clasificación de flujo 104 y al dispositivo de cálculo 118 a través de uno o más dispositivos de entrada 204. Los ejemplos de dispositivos de entrada 204 incluyen un teclado 206, un ratón 208, un micrófono 210 y un sensor táctil 212 (tal como un teclado táctil o una pantalla táctil 106). Otras formas de realización incluyen otros dispositivos de entrada 204. Los dispositivos de entrada suelen estar conectados al dispositivo de procesamiento 180 a través de una interfaz de entrada/salida 214 que se acopla al bus de sistema 184. Estos dispositivos de entrada 204 se pueden conectar mediante cualquier número de interfaces de entrada/salida, tales

como un puerto paralelo, un puerto serie, un puerto de juegos o un bus serie universal. La comunicación inalámbrica entre los dispositivos de entrada y la interfaz 214 también es posible, e incluye infrarrojos, tecnología inalámbrica BLUETOOTH®, 802.11 a/b/g/n, celular, u otros sistemas de comunicación por radiofrecuencia o electromagnéticos en algunas posibles formas de realización.

5 En esta forma de realización de ejemplo, un dispositivo de visualización 106, tal como un monitor, un dispositivo de visualización de cristal líquido, un proyector o un dispositivo de visualización sensible al tacto, también se conecta al bus de sistema 184 por medio de una interfaz, tal como un adaptador de vídeo 218. Además del dispositivo de visualización 106, el dispositivo de cálculo 118 puede incluir otros varios dispositivos periféricos (no mostrados), tales como altavoces o una impresora.

10 Cuando se utiliza en un entorno de red de área local o en un entorno de red de área amplia (tal como Internet), el dispositivo de cálculo 118 suele estar conectado a una red de comunicación de datos a través de una interfaz de red 220, tal como una interfaz Ethernet. Otras posibles formas de realización utilizan otros dispositivos de comunicación. Por ejemplo, algunas formas de realización del dispositivo de cálculo 118 incluyen un módem para comunicarse a través de la red.

15 El dispositivo de cálculo 118 normalmente incluye como mínimo alguna forma de medios legibles por computadora. Los medios legibles por computadora incluyen cualquier medio disponible al que se pueda acceder mediante el dispositivo de cálculo 118. A modo de ejemplo, los medios legibles por computadora incluyen medios de almacenamiento legibles por computadora y medios de comunicación legibles por computadora.

20 Los medios de almacenamiento legibles por computadora incluyen medios volátiles y no volátiles, extraíbles y no extraíbles implementados en cualquier dispositivo configurado para almacenar información tales como instrucciones legibles por computadora, estructuras de datos, módulos de programa u otros datos. Los medios de almacenamiento legibles por computadora incluyen, entre otros, la memoria de acceso aleatorio, la memoria de sólo lectura, la memoria de sólo lectura programable y borrable eléctricamente, la memoria flash u otra tecnología de memoria, la memoria de sólo lectura de discos compactos, los discos versátiles digitales u otro tipo de almacenamiento óptico, los casetes magnéticos, la cinta magnética, el almacenamiento en disco magnético u otros dispositivos de almacenamiento magnético, o cualquier otro medio que se pueda utilizar para almacenar la información deseada y al que se pueda acceder mediante el dispositivo de cálculo 118.

25 Los medios de comunicación legibles por computadora normalmente incorporan instrucciones legibles por computadora, estructuras de datos, módulos de programa u otros datos en una señal de datos modulada tal como una onda portadora u otro mecanismo de transporte e incluyen cualquier medio de suministro de información. El término "señal de datos modulada" se refiere a una señal que tiene una o más de sus características establecidas o modificadas de tal manera que la información se codifica en la señal. A modo de ejemplo, los medios de comunicación legibles por computadora incluyen medios cableados tales como una red por cable o una conexión directa por cable, y medios inalámbricos tales como los acústicos, de radiofrecuencia, infrarrojos y otros medios inalámbricos. Las combinaciones de cualquiera de los anteriores también se incluyen dentro del ámbito de los medios legibles por computadora.

30 El dispositivo de cálculo ilustrado en la FIG. 4 también es un ejemplo de electrónica programable, que puede incluir uno o más de dichos dispositivos de cálculo, y cuando se incluyen múltiples dispositivos de cálculo, dichos dispositivos de cálculo se pueden acoplar junto con una red de comunicación de datos adecuada con el fin de llevar a cabo colectivamente las diversas funciones, métodos u funcionamientos descritos en la presente memoria.

35 La FIG. 5 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra un método no deseable de funcionamiento del citómetro de clasificación de flujo 104. La FIG. 5 ilustra las gotas 136 de la boquilla de fluido 110, las placas de desviación 124A, 124B y los contenedores 126. Las gotas 136 incluyen dos gotas adyacentes 240 y 242, que se fusionan para formar la gota 244. Los contenedores 126 incluyen los contenedores 260, 262, 264, 266, 268, 270 y 272.

40 En este ejemplo, la electrónica de adquisición ha identificado previamente partículas en dos gotas adyacentes 240 y 242 que el motor de decisión de clasificación 162 determinó que pertenecían a los contenedores 262 y 272 respectivamente. Por consiguiente, la electrónica de control de clasificación 120 aplicó una carga ("-2") a la gota 240 para dirigir la gota 240 hacia el contenedor 262, y aplicó una carga ("+3") a la gota 242 para dirigir la gota 242 hacia el contenedor 272.

45 Los valores de carga utilizados en este ejemplo (por ejemplo, -2 y +3) representan la magnitud y la polaridad relativas de la carga necesaria para dirigir una gota hacia un contenedor deseado en una escala desde ninguna carga (representada por 0) hasta una magnitud de carga máxima (representada por 3).

50 Así, por ejemplo, se necesita una carga de -3 para dirigir una gota hacia el contenedor 260. Se necesita una carga de -2 para dirigir una gota hacia el contenedor 262. Se necesita una carga de +3 para dirigir una gota hacia el contenedor 272, y así sucesivamente. Las gotas no cargadas se dirigen hacia el contenedor 266 sin desviarse.

En la FIG. 5 se ilustra una secuencia de carga de gotas no deseada, que incluye la gota 240 con una carga negativa

relativamente alta (-2), y la gota 242 con una carga relativamente alta de la polaridad opuesta (+3). Como resultado de las cargas de polaridad opuesta en las gotas 240 y 242, se generan fuerzas entre las dos gotas que tienden a tirar de las dos gotas hacia la otra.

5 Si las magnitudes de las fuerzas son suficientes, como en este ejemplo, las gotas 240 y 242 se fusionan entre sí formando una gota combinada 244, antes de que las gotas sean clasificadas. Las cargas de las gotas 240 y 242, al ser opuestas en polaridad, se cancelan en gran medida, dando como resultado una carga combinada de menor magnitud (+1).

Como resultado de la unión, las gotas 240 y 242 que estaban destinadas a ser clasificadas en los contenedores 262 y 272 (a lo largo de las trayectorias 250 y 252), se dirigen en cambio a lo largo de la trayectoria 254 como una gota combinada 244' hacia el contenedor 268.

10 Esto tiene dos resultados no deseables. En primer lugar, las partículas dentro de las gotas 240 y 242 no se recogen en los contenedores apropiados 262 y 272. En segundo lugar, las partículas se dirigen de forma incorrecta hacia el contenedor 268, contaminando de este modo el contenido del contenedor 268 con partículas que podían no haber estado destinadas a estar en ese contenedor.

15 Un resultado no deseable similar se puede producir cuando las gotas 240 y 242 se cargan con las máximas magnitudes de carga de polaridades opuestas (por ejemplo, +3 y - 3). Sin embargo, en este ejemplo, cuando las gotas 240 y 242 se fusionan para formar una gota combinada 244, las cargas iguales y opuestas se cancelan entre sí, y la gota combinada 244 se dirige hacia el contenedor 266 con las otras gotas sin clasificar. Si bien este ejemplo no causa contaminación de los contenedores, da lugar a una reducción del rendimiento del citómetro de clasificación de flujo 104 al no clasificar las gotas que contienen las partículas deseadas.

20 La FIG. 6 es un diagrama de flujo que ilustra un método 280 de funcionamiento del citómetro de clasificación de flujo 104, de tal manera que se evite el funcionamiento no deseado ilustrado en la FIG. 5.

En este ejemplo, el método 280 incluye las operaciones 282 y 284.

25 La operación 282 se realiza para identificar una secuencia de carga de gotas no deseada. Un ejemplo de una secuencia de carga de gotas no deseada se ilustra en la FIG. 5, en la que dos o más gotas adyacentes 240 y 242 tienen cargas relativamente altas de polaridades opuestas.

En el ejemplo mostrado en la FIG. 5, la secuencia de carga de gotas de las gotas 240 y 242 es no deseable porque las cargas respectivas de las gotas 240 y 242 son suficientes para dar como resultado la fusión de las gotas 240 y 242 en una única gota 244 antes de la clasificación.

30 La operación 282 se puede realizar, por ejemplo, mediante el motor de decisión de clasificación 162 ejecutado en uno o más dispositivos de cálculo 118. Un ejemplo de la operación 282 se ilustra y describe con más detalle con referencia a la FIG. 8.

35 La identificación de la secuencia de carga de gotas no deseada en la operación 282 se realiza normalmente antes de la aplicación de las cargas a las gotas, e incluso antes de la formación real de las propias gotas 136. Como resultado, las referencias a la "secuencia de carga de gotas" se refieren a las decisiones preliminares de clasificación que se toman después de que una parte de fluido de la corriente de fluido 130 (FIG. 2) haya pasado por el punto de iluminación láser 132, pero antes de que la parte de fluido haya pasado por el punto de ruptura de gotas 134 para formar una gota diferente. Las decisiones preliminares de clasificación se suelen almacenar en un dispositivo de almacenamiento legible por computadora. En algunas formas de realización, el dispositivo de almacenamiento legible por computadora mantiene una cola, en la que cada entrada de la cola se asocia con una parte de fluido determinada que se espera que se rompa y forme una gota diferente. La entrada en la cola incluye la decisión preliminar de clasificación, que si finaliza y pasa como señal de control de clasificación 154, hará que la gota se clasifique en el contenedor apropiado 126. Las decisiones preliminares de clasificación se pueden evaluar para las gotas adyacentes para identificar las secuencias de gotas no deseadas en la cola.

45 Cuando se identifica una secuencia de carga de gotas no deseada, se realiza a continuación la operación 284 para abortar una operación de clasificación de cómo mínimo una de las gotas de la secuencia para evitar la formación de la secuencia de carga de gotas no deseada. Un ejemplo se ilustra en la FIG. 7. Una operación de clasificación se puede abortar asignando una carga neutra a la gota que se aborta. Los detalles adicionales de un ejemplo de funcionamiento 284 se describen con referencia a la FIG. 10.

50 La FIG. 7 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra un método deseable de funcionamiento del citómetro de clasificación de flujo 104, utilizando el método 280, mostrado en la FIG. 6, y en contraste con el funcionamiento no deseable ilustrado en la FIG. 5.

El citómetro de clasificación de flujo 104 mostrado en la FIG. 7 es el mismo mostrado en la FIG. 5, excepto que el método

280 se utiliza para detectar la secuencia de carga de gotas no deseable antes de que se forme, y para abortar la operación de clasificación para una de las gotas 240.

En este ejemplo, el motor de decisión de clasificación 162 evaluó las decisiones preliminares de clasificación para las gotas 240 y 242 e identificó una secuencia de carga de gotas no deseable, en la que las dos gotas adyacentes se iban a cargar con altas cargas opuestas. Como resultado, el motor de decisión de clasificación 162 modificó la decisión preliminar de clasificación para abortar la clasificación de una de las gotas 240 y 242. Más específicamente, el motor de decisión de clasificación 162 determinó abortar la clasificación de la gota 240. Se asignó una carga neutra a la gota 240, y como resultado, la gota 240 no fue cargada por la electrónica de control de clasificación 120, sino que la gota 242 fue cargada por la electrónica de control de clasificación 120 de acuerdo con la decisión de clasificación (+3).

5
10 Como resultado de la decisión de clasificación modificada, la gota sin carga 240' no fue desviada por las placas de desviación 124A, 124B, y continuó en línea recta a lo largo de la trayectoria 302 hacia el contenedor 266. Por otro lado, la gota cargada 242' fue desviada a lo largo de la trayectoria 304, para clasificar correctamente la gota 242' en el contenedor 272.

15 El motor de decisión de clasificación 162 podría alternativamente elegir abortar la clasificación de la gota 242 y continuar con la clasificación de la gota 240. En este caso, la gota 240 se cargaría (-2) y se clasificaría en el contenedor 262, mientras que la gota 242 permanece sin cargar y se pasa al contenedor 266.

20 Por lo tanto, utilizando las operaciones mostradas en la FIG. 6, se mejora el citómetro de clasificación de flujo 104. Por ejemplo, ninguna de las gotas 240 ó 242 se suministró a un contenedor no deseado, como ocurrió en el ejemplo mostrado en la FIG. 5. Por lo tanto, la pureza de la clasificación se mejora enormemente al reducir o eliminar la clasificación errónea de las partículas en los contenedores incorrectos. En algunas formas de realización, la pureza de la clasificación es mayor o igual al 99% para cada contenedor. Además, aunque una de las gotas se pase al contenedor 266 sin clasificar, el citómetro de clasificación de flujo puede elegir cuál de las gotas se clasifica y cuál de las gotas pasa al contenedor 266. A menudo, una de las gotas contendrá partículas más importantes que la otra. Como resultado, en algunas formas de realización el motor de decisión de clasificación 162 clasifica las gotas utilizando una prioridad predeterminada para identificar las partículas más importantes y seleccionar la gota que contiene esas partículas para su clasificación, mientras que permite que la gota que contiene las partículas menos importantes pase al contenedor 266.

25 La FIG. 8 ilustra un método de ejemplo para identificar una secuencia de carga de gotas no deseada. El método también es un ejemplo de la operación 282, mostrada en la FIG. 6. En este ejemplo, la operación 282 incluye las operaciones 322, 324 y 326.

30 La operación 322 se realiza para generar decisiones preliminares de clasificación. Las decisiones preliminares de clasificación se toman en función de las partículas identificadas en partes de la corriente de fluido, y las definiciones lógicas de clasificación que definen hacia dónde se deben dirigir las gotas si contienen determinadas partículas. Las decisiones de clasificación se toman para cada parte de la corriente de fluido en función de la separación prevista de la corriente en gotas individuales, de tal manera que se toma una decisión de clasificación para cada gota.

35 En la operación 324 las decisiones preliminares de clasificación tomadas en la operación 322 se almacenan en un dispositivo de almacenamiento legible por computadora. En algunas formas de realización, las decisiones de clasificación se almacenan como una cola en una memoria intermedia. Un ejemplo de una memoria intermedia de este tipo se ilustra en la FIG. 9. Algunas formas de realización utilizan una memoria intermedia circular. Algunas formas de realización utilizan un búfer de memoria de acceso directo a la memoria (DMA).

40 La operación 326 evalúa las decisiones preliminares de clasificación para identificar las secuencias de carga de gotas no deseadas. Más concretamente, la operación 326 evalúa las decisiones preliminares de clasificación para determinar si las decisiones de clasificación darían como resultado una secuencia de gota en la que las gotas adyacentes tuviesen un diferencial de carga inaceptablemente alto.

45 En algunas formas de realización, la operación 326 utiliza una ventana corrediza para evaluar una parte de las decisiones preliminares de clasificación a la vez. La ventana corrediza puede incluir dos, tres, cuatro, o cinco o más decisiones de clasificación para un número correspondiente de segmentos de fluido en la corriente de fluido. La operación 326 evalúa a continuación las decisiones de clasificación dentro de la ventana corrediza para identificar las secuencias de carga de gotas no deseables.

50 En algunas formas de realización, las secuencias de carga de gotas no deseables se identifican comparando las decisiones de clasificación con un conjunto de secuencias de carga de gotas no deseables predeterminadas, tales como las almacenadas en una tabla de búsqueda. Si se encuentra una coincidencia, la secuencia de gotas se identifica como una secuencia de gotas no deseada. A continuación, se realiza un procesamiento adicional, tal como se muestra en la FIG. 10.

- En otra forma de realización, las secuencias de carga de gotas no deseadas se identifican comparando las cargas de gota asignadas a las gotas con valores de desviación máxima predeterminados. Por ejemplo, cada carga de gotas se evalúa primero para determinar si la carga de gotas excede un valor máximo de desviación. Si es así, las gotas adyacentes se evalúan para determinar si alguna de las gotas adyacentes excede un valor máximo de desviación opuesto. Si una o
- 5 ambas cargas asignadas a las gotas adyacentes exceden el valor máximo de desviación opuesto, las gotas asociadas se identifican como una secuencia de carga de gotas no deseada.
- En algunas formas de realización, a las cargas de gota se les asigna un valor entre cero y un valor máximo (por ejemplo, 32.767), donde el valor máximo representa el voltaje máximo que se puede aplicar por la electrónica de control de clasificación 120 para cargar la corriente de fluido 130. Las cargas de gota también incluyen una polaridad, tal como
- 10 positiva o negativa. Los valores máximos de desviación se configuran a continuación en un valor entre 0 y el valor máximo. Por ejemplo, un valor de 19.660 se puede utilizar en algunas formas de realización, aunque otras formas de realización utilizan otros valores. Los valores de desviación máxima se pueden ajustar en función de diversos factores, tales como el tamaño de la boquilla, por ejemplo.
- El valor máximo de desviación opuesto se asigna de manera similar como un valor entre 0 y el valor máximo. Por ejemplo,
- 15 en algunas formas de realización se puede utilizar un valor de 8.191, aunque en otras formas de realización se utilizan otros valores. Los valores máximos de desviación opuestos también se pueden ajustar en función de diversos factores, como el tamaño de la boquilla, por ejemplo.
- En algunas formas de realización, la secuencia de carga de gotas no deseada se identifica calculando un diferencial de carga entre las gotas adyacentes y determinando si el diferencial de carga supera un umbral.
- 20 En algunas formas de realización, el valor máximo de desviación, el valor máximo de desviación opuesto y/o el umbral se determinan mediante pruebas, en las que los valores se establecen de manera que se superen cuando dos gotas adyacentes tengan un diferencial de carga suficiente de modo que se fusionarían si no fuera abortada la clasificación de cómo mínimo una de las gotas.
- En algunas formas de realización, se puede realizar un cálculo para generar los valores máximos de desviación, los valores
- 25 máximos de desviación opuestos y/u otros valores umbrales. El cálculo puede determinar los valores máximos de desviación en los que las gotas comenzarán a fusionarse. El cálculo puede incluir factores tales como: el tamaño de la boquilla de fluido, una distancia de caída de gota entre el punto de ruptura de gotas y las placas de desviación cargadas, el tiempo que tarda una gota en recorrer la distancia de caída de gota, las masas de gota, las magnitudes de carga de gota, los diferenciales de carga de gota entre gotas adyacentes, las polaridades de carga de gota, la presión de la vaina y
- 30 la velocidad de la corriente.
- En algunas formas de realización, el cálculo se realiza automáticamente cada vez que cambia un factor relevante, tal como, después del ajuste del tamaño de la boquilla de fluido.
- La FIG. 9 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra una memoria intermedia de ejemplo que contiene decisiones preliminares de clasificación. En este ejemplo, las decisiones preliminares de clasificación identifican una posición de gota
- 35 332 y una carga a aplicar 334 a la gota de acuerdo con la decisión preliminar de clasificación.
- En este ejemplo, la posición de la gota 332 identifica la posición de la gota dentro de la corriente de fluido 130. Por ejemplo, la letra N representa la parte del segmento de fluido que está al lado de cruzar el punto de ruptura de gotas 134 (FIG. 2). Cada gota se incrementa a partir de esta gota en orden consecutivo, de tal manera que "N+1" representa el segundo segmento de fluido, "N+2" representa el tercer segmento de fluido, etc.
- 40 La carga a aplicar 334 se almacena a continuación para cada posición de gota 332. En algunas formas de realización la carga de gota es un número entre 0 y el valor máximo (por ejemplo, 32.767), que representa el voltaje máximo que se puede aplicar mediante la electrónica de control de clasificación 120 a la corriente de fluido 130, y una polaridad (por ejemplo, positiva o negativa).
- Para simplificar, en la FIG. 9 (y en otras partes de la presente memoria) se utiliza una notación abreviada, en la que el
- 45 valor máximo es 3, lo que da como resultado seis posibles cargas (-3, -2, -1, +1, +2 y +3). Utilizando esta notación y con referencia a la FIG. 7, una gota a la que se asigna una carga de -3 está destinada a ser dirigida hacia el contenedor más distante 260, -2 dirige hacia el contenedor 262, -1 dirige hacia el contenedor 264, +1 dirige hacia el contenedor 268, +2 dirige hacia el contenedor 270 y +3 dirige hacia el contenedor 272. Las gotas no cargadas se dirigen al contenedor 266.
- En este ejemplo, al motor de decisión de clasificación se le ha asignado un valor diferencial máximo de 2 y un valor
- 50 diferencial máximo en oposición de 1.
- Utilizando estos valores, las gotas se evalúan para una secuencia de clasificación no deseada. En este ejemplo, se identifican dos gotas, etiquetadas como N+1 y N+3, que tienen una magnitud (3) que supera el valor diferencial máximo (2). Como resultado, las gotas adyacentes se evalúan para determinar si superan el valor diferencial máximo de oposición

(1).

La gota N y N+4 tienen una magnitud de (1) que no excede el máximo valor diferencial en oposición (1). Sin embargo, la gota N+2 tiene una magnitud (2) que supera valor diferencial en oposición (1). Por consiguiente, las gotas N+1, N+2 y N+3 se identifican como una secuencia de clasificación no deseada para su posterior procesamiento, tal como se muestra en la FIG. 10.

5

La FIG. 10 ilustra un método de ejemplo de identificación de una o más gotas para las cuales se debe abortar la clasificación, después de identificar una secuencia de carga de gotas no deseada. El método es también un ejemplo de la operación 284, mostrado en la FIG. 6. En este ejemplo, la operación 284 incluye las operaciones 342, 344, 346 y 348.

La operación 342 se realiza para identificar una prioridad de cada gota en la secuencia de gota. En algunas formas de realización, las prioridades de las gotas se asignan en función de los tipos o cantidades de partículas de una gota. Las prioridades de gota se pueden seleccionar por el usuario en algunas formas de realización.

10

En algunas formas de realización, las gotas se asocian con uno de los varios modos de gota en función de las partículas contenidas en la gota. Los ejemplos de los modos de gota incluyen el modo único, el modo purificador y un modo enriquecido. Una gota de modo único es una gota que contiene una única partícula. Una gota de modo purificador es aquella que contiene una o más partículas de un único tipo. Una gota de modo enriquecido es aquella que contiene una partícula importante, pero también puede contener otras partículas de otros tipos. En algunas formas de realización, las prioridades se asignan en función del modo de gota, en el que único es la prioridad más alta, purificador tiene una prioridad más baja y enriquecido tiene la prioridad más baja.

15

En otra posible forma de realización, las prioridades se asignan en función de las posiciones de los contenedores, en las que los contenedores exteriores tienen una mayor prioridad que los interiores. En el caso de un empate, se puede dar mayor prioridad a los contenedores del lado izquierdo que a los del lado derecho, o viceversa.

20

En algunas formas de realización, se asignan valores a cada nivel de prioridad, tales como 1 a 3, donde 3 es la prioridad más baja. También se pueden utilizar otros valores en otras formas de realización.

En algunas formas de realización, las prioridades se almacenan en la memoria intermedia 330 junto con las decisiones preliminares de clasificación de la gota. Un ejemplo se ilustra en la FIG. 11.

25

La operación 344 se realiza para identificar una o más gotas en la secuencia de carga de gotas no deseada que tengan la menor prioridad.

La operación 346 aborta la aplicación de una carga a la una o más gotas de la secuencia que tengan las menores prioridades.

30

Las decisiones finales de clasificación se almacenan en un dispositivo de almacenamiento legible por computadora en la operación 348, tal como en la misma u otra memoria intermedia, para generar la señal de control de clasificación 154 (FIG. 3). Un ejemplo se ilustra en la FIG. 12.

Como resultado de estas decisiones, la decisión final de clasificación hace que el citómetro de clasificación de flujo no aplique de forma selectiva la carga preasignada a una de las gotas, mientras que aplica las otras cargas preasignadas (que se convierten en las decisiones finales de clasificación) a las otras gotas que no se abortan.

35

La FIG. 11 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra otra memoria intermedia de ejemplo 330', similar a la mostrada en la FIG. 9, pero que también contiene datos de prioridad 352.

En este ejemplo, cada una de las gotas identificadas en la memoria intermedia 330' incluye un número de posición 332, una carga a aplicar 334, y una prioridad 352,

40

Después de identificar una secuencia de carga de gotas no deseada, según se muestra, se identifican y evalúan las prioridades de las gotas en la secuencia. En este ejemplo, la gota N+1 tiene una prioridad de 1 (alta), la gota N+2 tiene una prioridad de 2 (media) y la gota N+3 tiene una prioridad de 1 (alta). Por consiguiente, se determina que la gota N+2 tiene la menor prioridad.

Una vez que se ha identificado la gota o las gotas de menor prioridad, se aborta la clasificación de la gota o las gotas asociadas. De modo que, en este ejemplo, la clasificación de la gota N+2 se aborta. Las decisiones finales de clasificación se generan a continuación según se muestra en la FIG. 12.

45

En otra posible forma de realización, las decisiones de clasificación incluyen decisiones de clasificación primarias y decisiones de clasificación secundarias. Las decisiones descritas anteriormente son ejemplos de decisiones de tipo primario. A una gota también se le puede asignar una decisión de clasificación secundaria. En el caso de que una decisión

5 de clasificación primaria deba ser abortada, a la gota se le puede asignar una decisión de clasificación secundaria. A continuación, se repite la evaluación de la decisión de clasificación para determinar si la decisión de clasificación secundaria seguiría aun dando como resultado una secuencia de carga de gotas no deseada, o si la decisión de clasificación secundaria elimina la secuencia de carga de gotas no deseada. Si la decisión de clasificación secundaria resuelve el problema, se permite que la clasificación de la gota proceda de acuerdo con la decisión secundaria, Si la decisión de clasificación secundaria sigue dando como resultado una secuencia de carga de gotas no deseada, se aborta la clasificación de una o más gotas que tengan la menor prioridad.

10 La FIG. 12 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra una memoria intermedia de ejemplo 362 en la que las decisiones preliminares de clasificación (mostradas en las FIG. 9 y 11) se modifican para abortar la operación de clasificación de una o más gotas para evitar la formación de una secuencia de carga de gotas no deseada. Más específicamente, la carga asignada a la gota N+2 se ha cambiado de modo que no se aplicará una carga a esta gota. Abortando la clasificación de la gota N+2, la clasificación de las gotas N+1 y N+3 puede proceder a dirigir las gotas de alta prioridad hacia los contenedores apropiados.

15 La Tabla 1 ilustra algunos ejemplos adicionales de posibles secuencias de gota y las decisiones asociadas que se pueden adoptar para abortar una o más gotas. Un asterisco representa una gota que es parte de una secuencia de gotas no deseada. El número entre paréntesis seguido de la letra "P" indica la prioridad de la gota.

Secuencia	Carga gota N	Carga gota N+1	Carga gota N+2	Carga gota N+3	Carga gota N+4	Gotas Abortadas
1	-1	-3* (P1)	+2* (P2)	-1	0	N+2
2	-1	-3* (P2)	+2* (P1)	-1	0	N+1
3	-1	+2* (P1)	-3* (P2)	-1	0	N+2
4	-1	+2* (P2)	-3* (P1)	-1	0	N+1
5	-1	-3* (P1)	+2* (P2)	-3* (P1)	0	N+2
6	-1	-3* (P2)	+2* (P1)	-3* (P2)	0	N+1 y N+3
7	-1	+2* (P1)	*3* (P2)	+2* (P1)	0	N+2
8	-1	+2* (P2)	-3* (P1)	+2*(P2)	0	N+1 y N+3
9	-1	+2* (P3)	-3* (P2)	+2* (P1)	0	N+2

REIVINDICACIONES

1. Un método de funcionamiento de un citómetro de clasificación de flujo, comprendiendo el método:
 - identificar, con un dispositivo de cálculo (118), una secuencia de carga de gotas no deseada asignada a dos o más gotas adyacentes (240, 242), que tienen la posibilidad de ser arrastradas una hacia la otra y fusionarse en una única gota debido a un diferencial de carga total entre las como mínimo dos gotas adyacentes, antes de la separación de las gotas (136) de una corriente de fluido (130); y
 - abortar una operación de clasificación de cómo mínimo una de las gotas (136) de la secuencia de carga de gotas no deseada en la corriente de fluido (130) para evitar la secuencia de carga de gotas no deseada.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia de carga de gotas no deseada incluye como mínimo dos gotas adyacentes (240, 242) asignadas para ser cargadas con cargas de polaridades opuestas, en donde un diferencial de carga total entre las dos gotas adyacentes como mínimo (240, 242) supera un umbral predeterminado.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia de carga de gotas no deseada incluye dos gotas adyacentes (240, 242) que se fusionarán para formar una única gota si la operación de clasificación no se aborta como mínimo en una de las gotas (136).
4. El método de la reivindicación 1, en donde el citómetro de clasificación de flujo (104) es como mínimo un citómetro de clasificación de seis vías que incluye tres contenedores colocados en un lado de la corriente de fluido (130) y como mínimo tres contenedores colocados en otro lado opuesto de la corriente de fluido (130), y en donde la secuencia de carga de gotas no deseada incluye una primera gota asignada al contenedor más distante en un lado de la corriente de fluido (130), y uno de los dos contenedores más distantes en el otro lado de la corriente de fluido (130).
5. El método de la reivindicación 1, en donde el citómetro de clasificación de flujo (104) almacena como mínimo una tabla de búsqueda que enumera las secuencias de carga de gotas no deseadas, y en donde la identificación de una secuencia de carga de gotas no deseada implica la identificación de una secuencia de carga de gotas enumerada en la una tabla de búsqueda como mínimo.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la identificación de una secuencia de carga de gotas no deseada implica la evaluación de factores seleccionados entre: un tamaño de boquilla de fluido, una distancia de caída de gota entre un punto de ruptura de gotas y las placas de desviación cargadas (124A, 124B), el tiempo que tarda una gota en recorrer la distancia de caída de gota, las masas de gota, las magnitudes de carga de gota, los diferenciales de carga de gota entre gotas adyacentes (240, 242), las polaridades de carga de gota, la presión de la vaina y la velocidad de la corriente.
7. El método de la reivindicación 1, en donde abortar una operación de clasificación para como mínimo una de las gotas (136), comprende la asignación de una decisión de clasificación secundaria a como mínimo una de las gotas (136).
8. Un citómetro de clasificación de flujo (104) que comprende:
 - una boquilla de fluido configurada para recibir una entrada de fluido y generar una corriente de fluido (130) a lo largo de una trayectoria de fluido;
 - un láser configurado para generar un rayo láser y colocarlo para dirigir el rayo láser a la corriente de fluido (130);
 - electrónica de adquisición que incluye un analizador detector dispuesto y configurado para detectar la luz del láser después de que el rayo láser haya intersecado la corriente de fluido (130); un dispositivo de cálculo (118) que:
 - recibe los datos de eventos de la electrónica de adquisición y genera decisiones preliminares de clasificación asignadas a los segmentos de la corriente de fluido (130);
 - identifica una secuencia de carga de gotas no deseada asignada a como mínimo dos segmentos adyacentes de la corriente de fluido (130);
 - genera decisiones finales de clasificación modificando las decisiones preliminares de clasificación para abortar una operación de clasificación para como mínimo uno de los segmentos de fluido; y
 - genera una señal de control de clasificación de acuerdo con las decisiones finales de clasificación;
 - la electrónica de control de clasificación (120) recibe la señal de control de clasificación y aplica de forma selectiva cargas a la corriente de fluido (130); y
 - las placas de desviación (124A, 124B) dispuestas adyacentes a la trayectoria de fluido para clasificar las gotas (136) asociadas con los segmentos de fluido de la corriente de fluido (130) en varios contenedores.

9. Un medio legible por computadora que almacena instrucciones de programa, en donde las instrucciones de programa, cuando se ejecutan mediante un dispositivo de procesamiento (180) dentro de un citómetro de clasificación de flujo (104), hacen que el dispositivo de procesamiento (180):
- 5 identifique una secuencia de carga de gotas no deseada asignada a como mínimo dos gotas adyacentes (240, 242) que tienen la posibilidad de ser arrastradas una hacia la otra y fusionarse en una única gota debido a un diferencial de carga total entre las dos gotas adyacentes como mínimo, antes de la separación de las gotas (136) de una corriente de fluido (130); y
- abortar una operación de clasificación para como mínimo una de las gotas (136) de la secuencia de carga de gotas no deseada en la corriente de fluido (130) para evitar la secuencia de carga de gotas no deseada.
- 10 10. El método de la reivindicación 1, en donde se aborda la operación de clasificación en función de una prioridad predeterminada para cada tipo de partícula.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la prioridad es un valor asignado.
12. El método de la reivindicación 11, en donde la prioridad es función de un modo de gota para la partícula respectiva.
13. El método de la reivindicación 12, en donde el modo de gota es uno de modo único, modo purificador y modo enriquecido, en donde una gota de modo único es una gota que contiene una sola partícula, una gota de modo purificador es una gota que contiene una o más partículas de un único tipo, y una gota de modo enriquecido es una gota que contiene como mínimo una partícula de alta prioridad, pero también puede contener otras partículas de otros tipos.
- 15 14. El método de la reivindicación 1, en donde una secuencia de carga de gotas incluye cargas relativas de +/- a, +/-b, o +/- c, en las que las cargas relativas de +/-b y/o +/- c forman una secuencia de carga de gotas no deseada, siendo una de dichas cargas +/- a, +/-b, o +/- c preasignadas a una primera gota y una segunda gota, respectivamente, en la que $a < b < c$, y en donde abortar la operación de clasificación incluye asignar una carga neutra ya sea a la primera gota o a la segunda gota si la combinación de las cargas preasignadas es una de +c y -b; +c y -c; y +b y -c.
- 20

FIG. 1

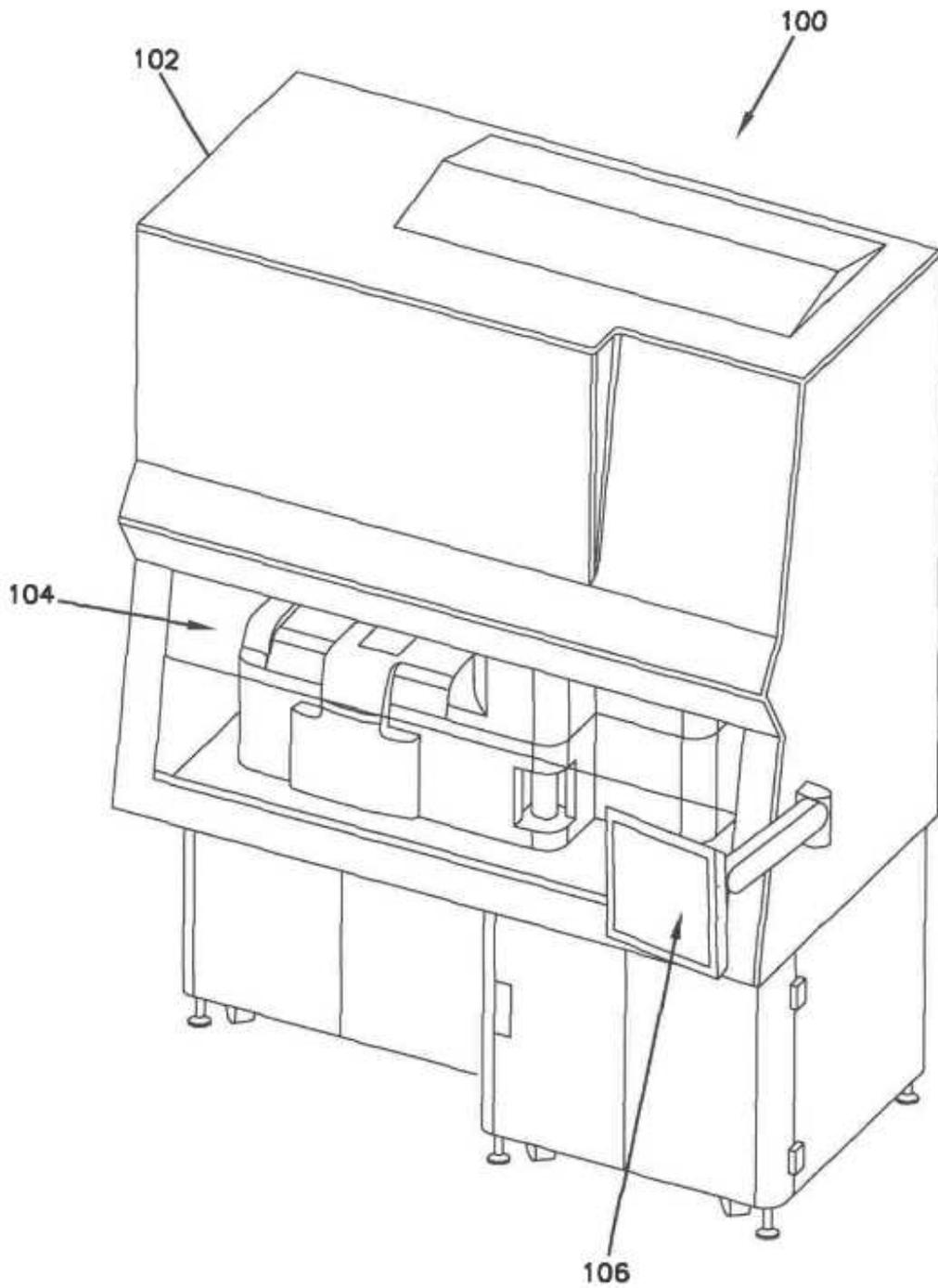


FIG. 2

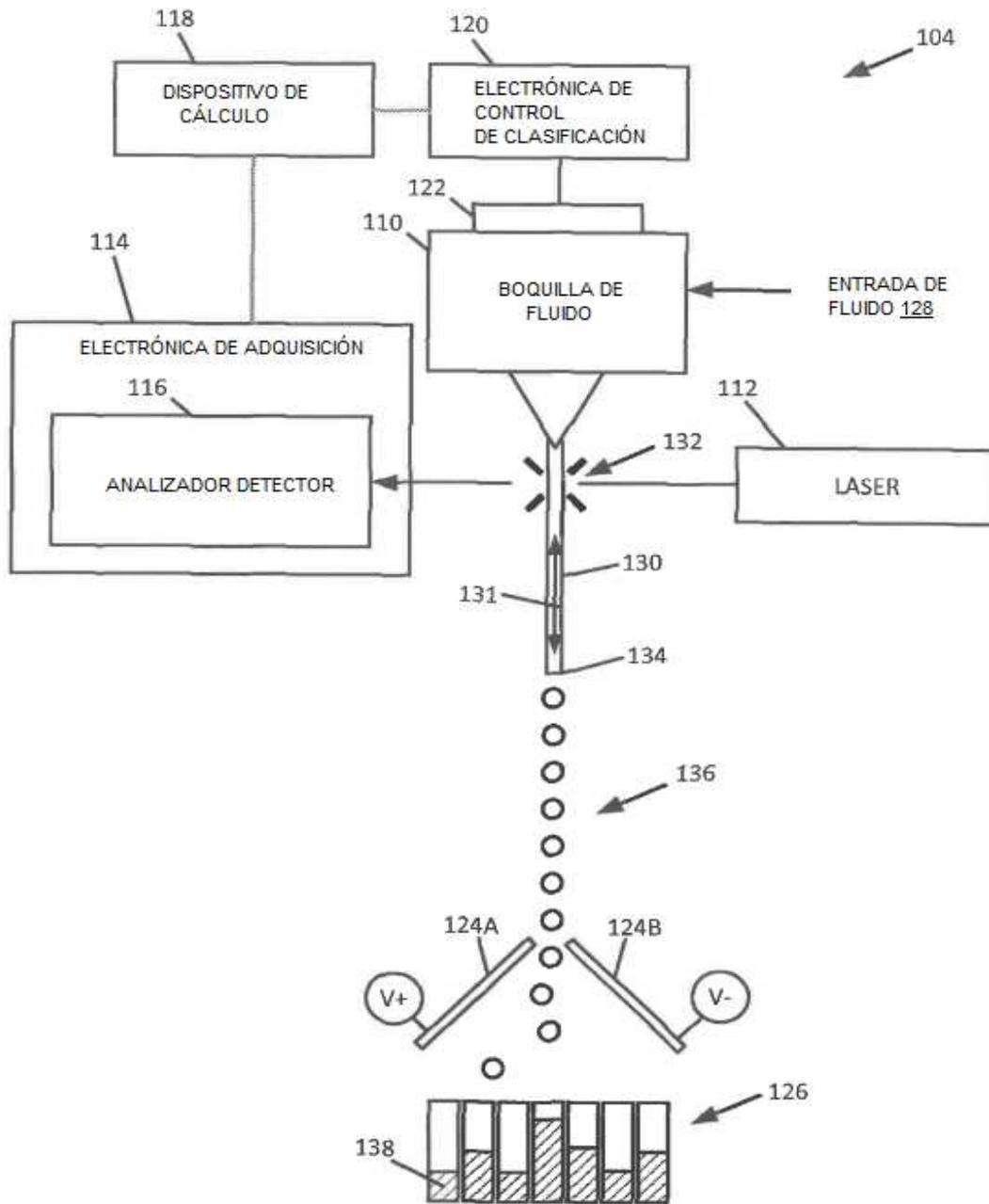


FIG. 3

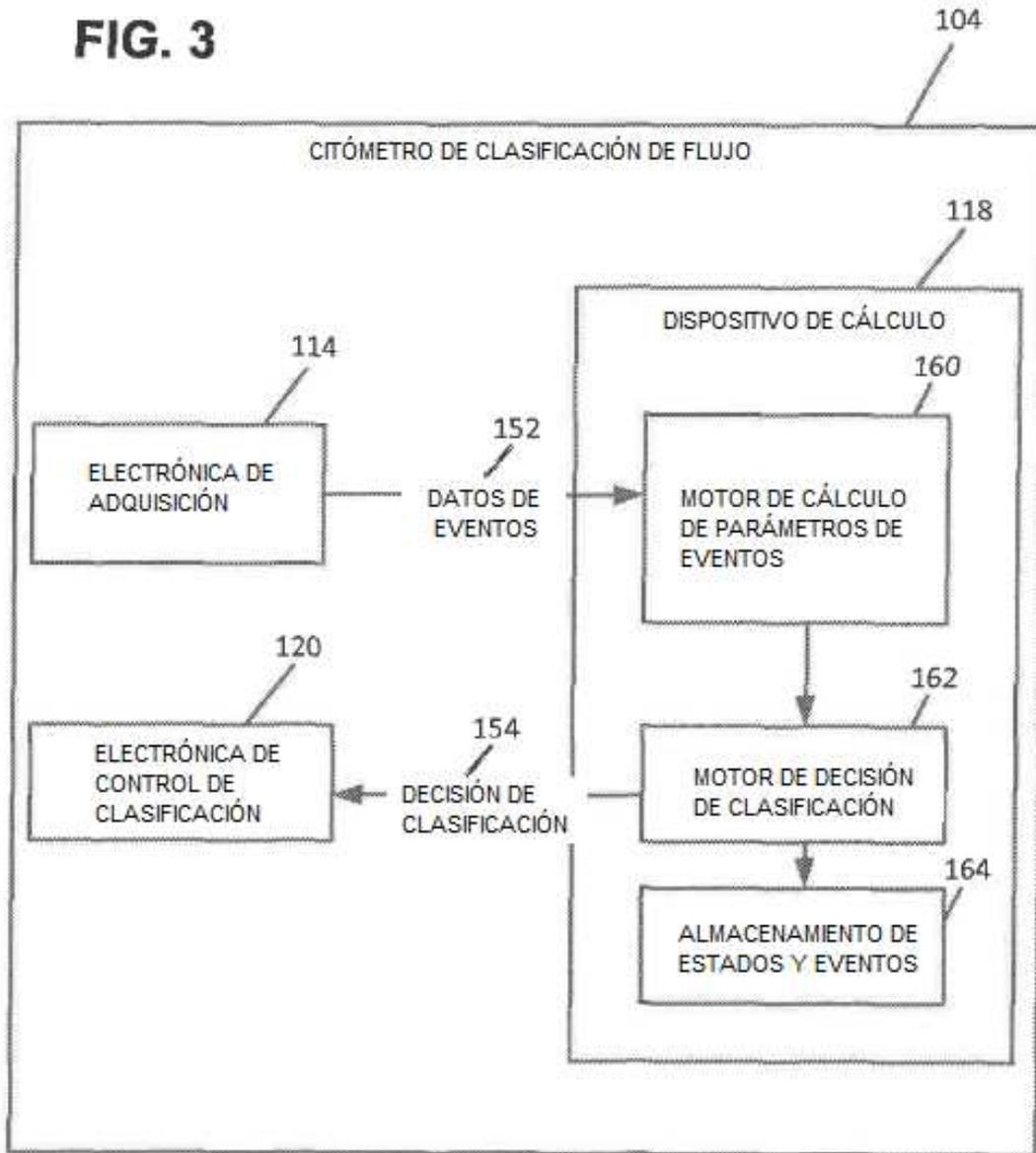


FIG. 4

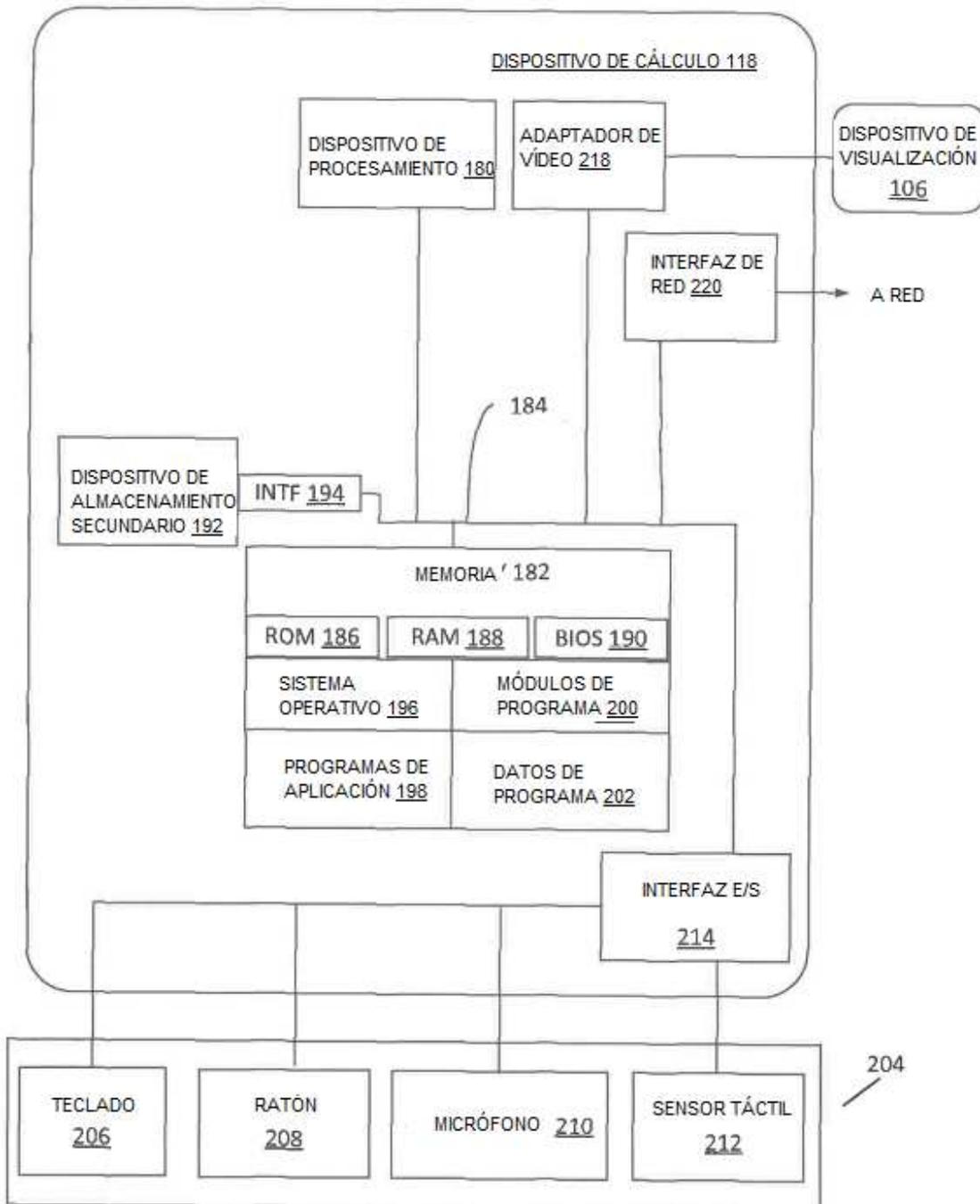


FIG. 5

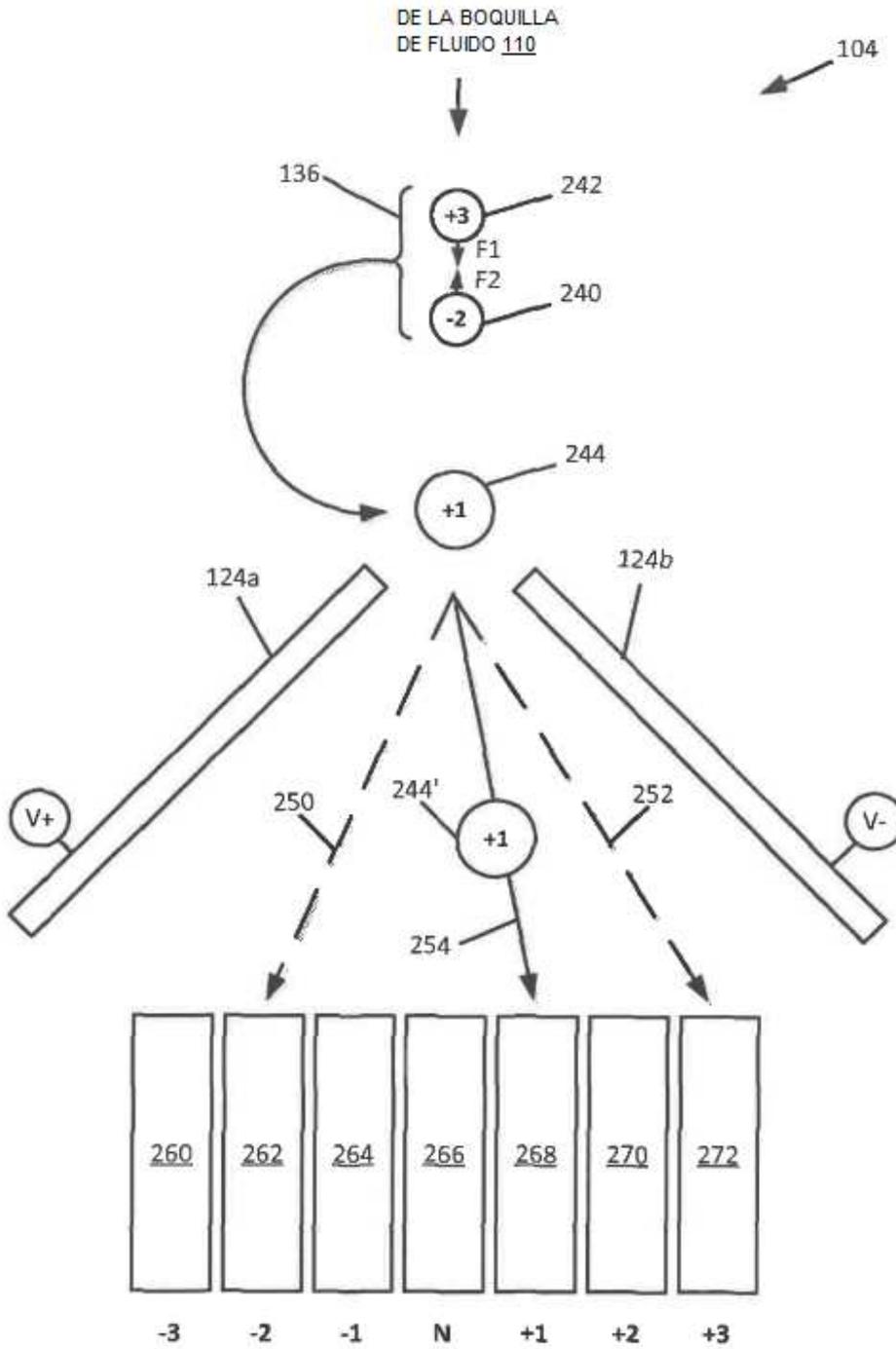


FIG. 6

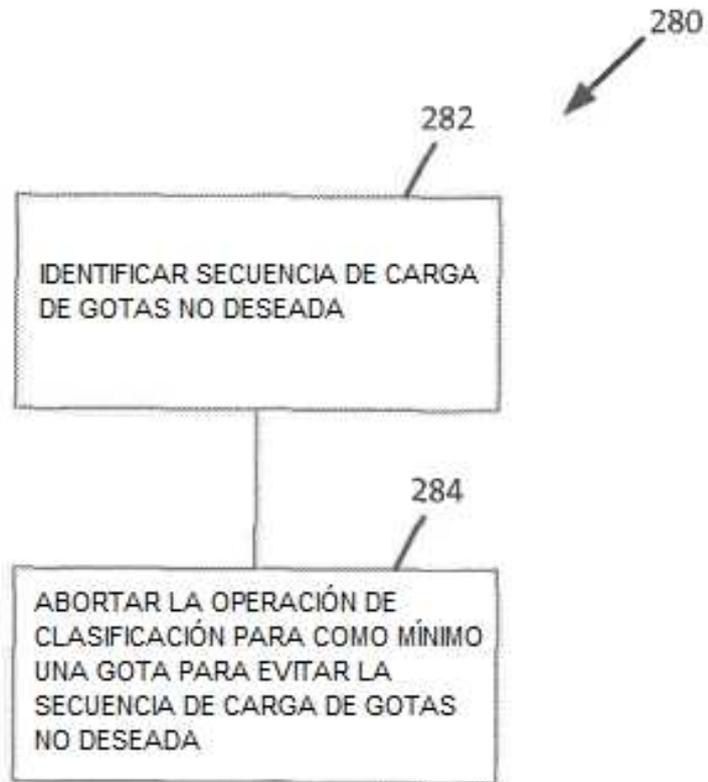


FIG. 7

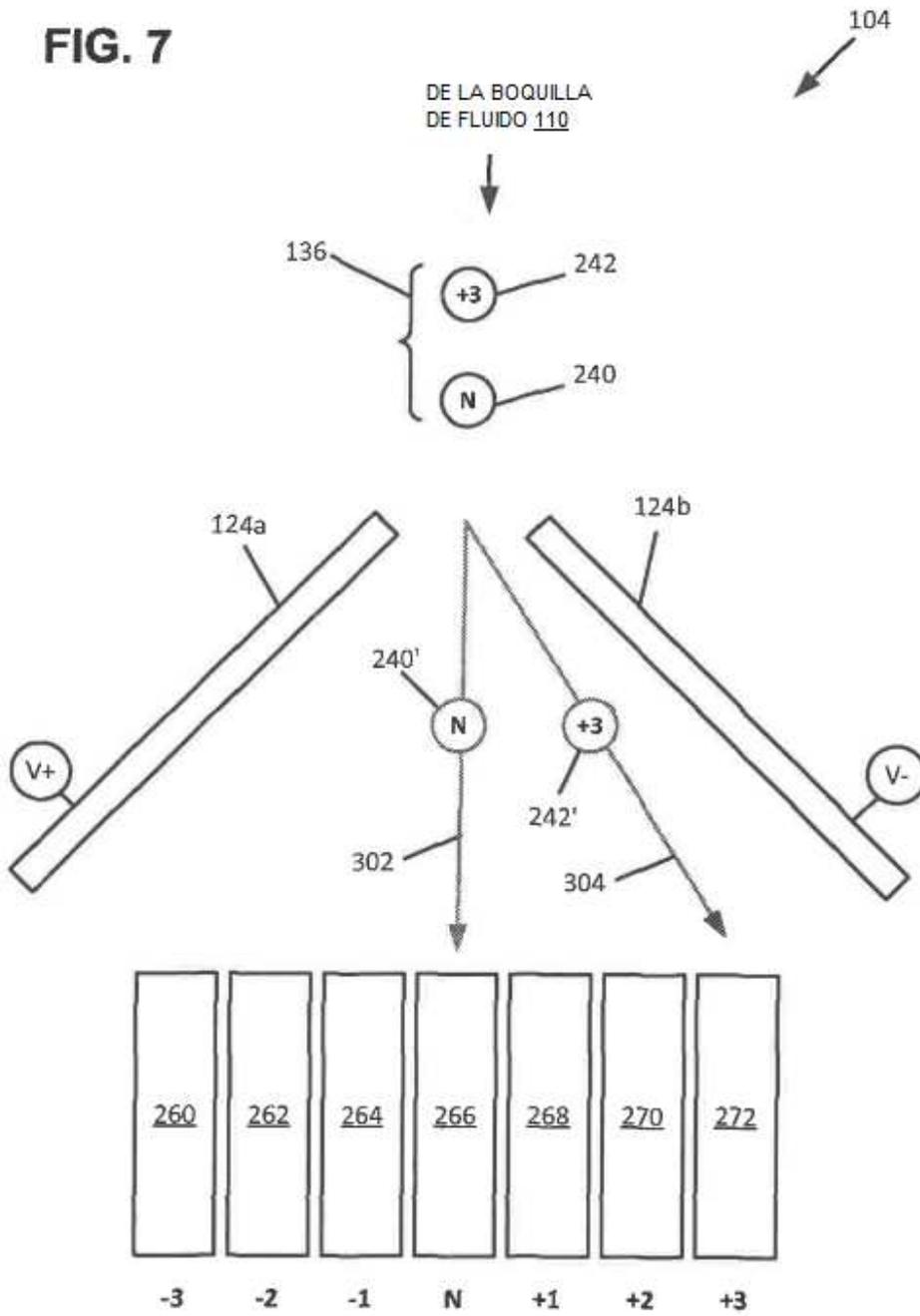


FIG. 8

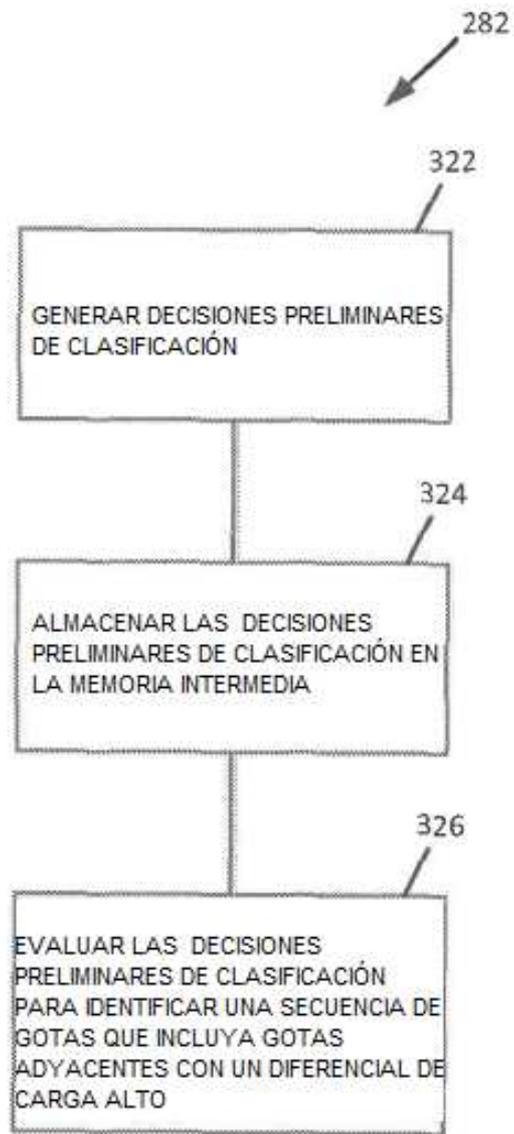


FIG. 9



FIG. 10

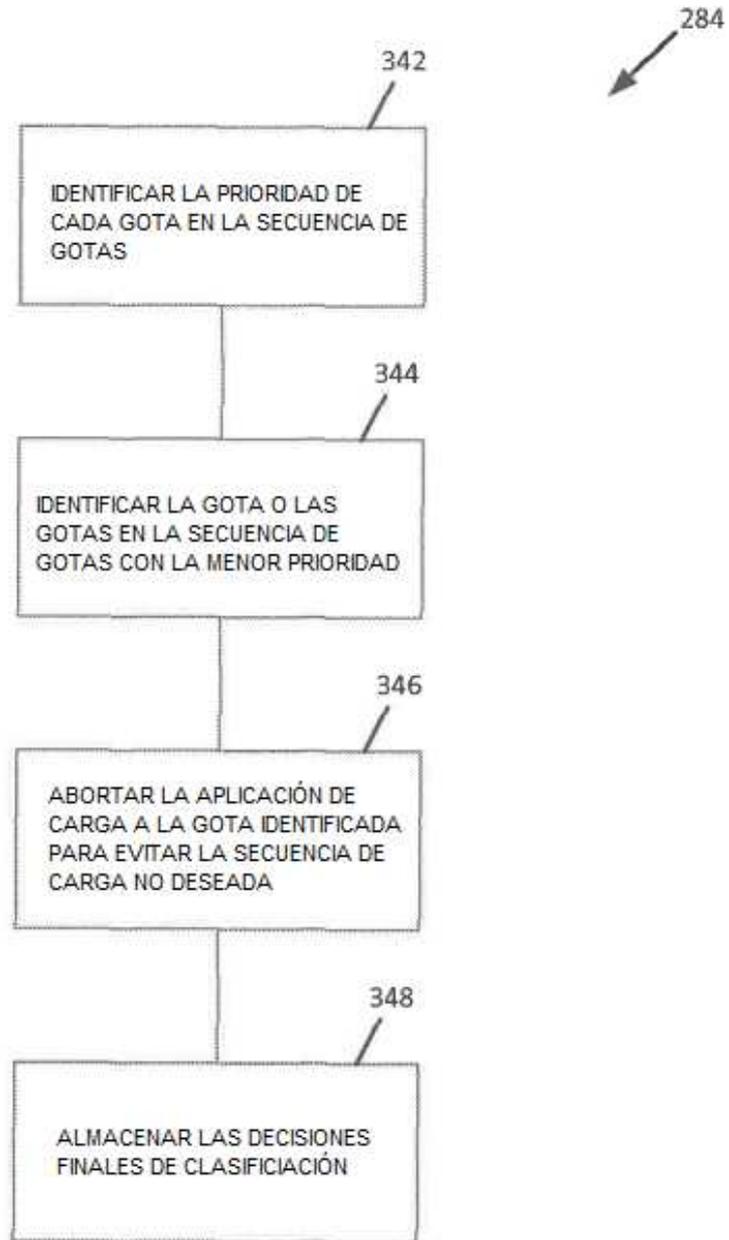


FIG. 11

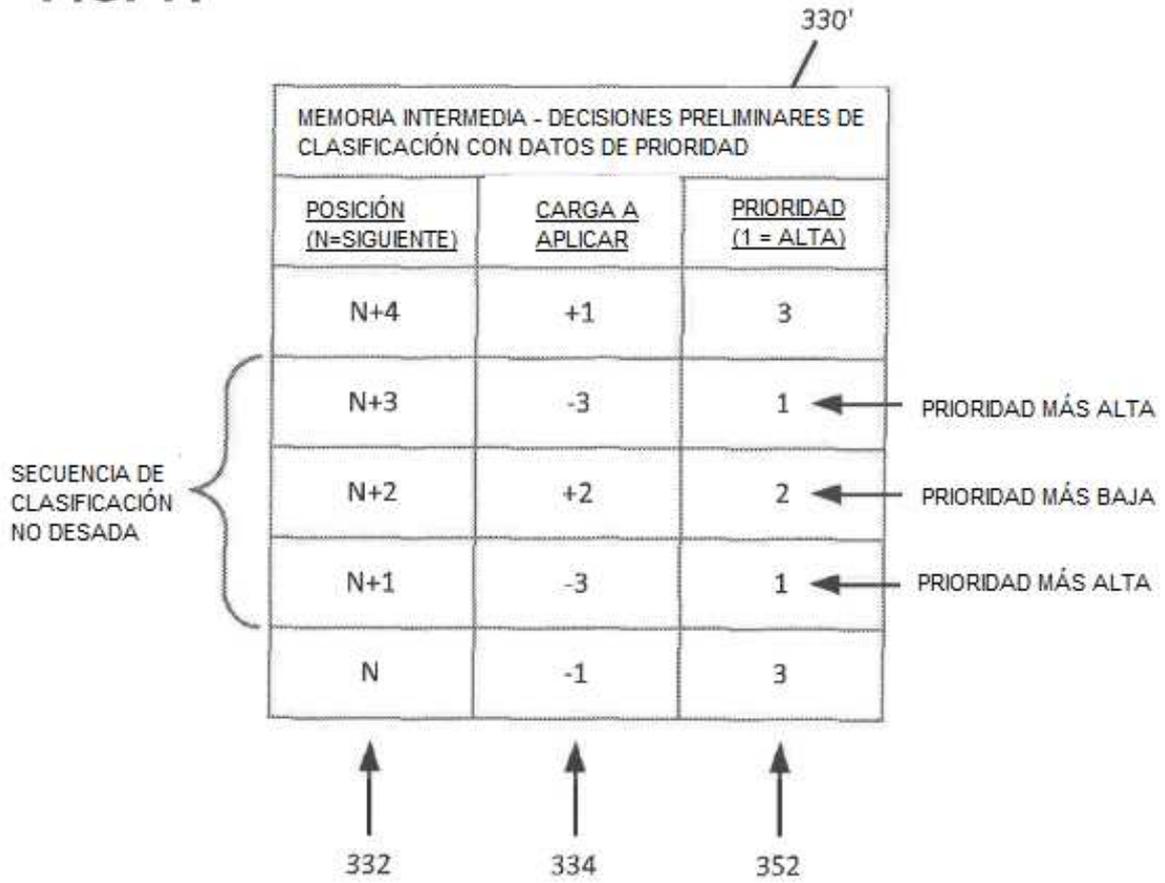


FIG. 12

362

MEMORIA INTERMEDIA - DECISIONES FINALES DE CLASIFICACIÓN	
<u>POSICIÓN</u> (N=SIGUIENTE)	<u>CARGA A</u> <u>APLICAR</u>
N+4	+1
N+3	-3
N+2	NINGUNA
N+1	-3
N	-1

ABORTAR CLASIFICACIÓN
PARA ESTA GOTA