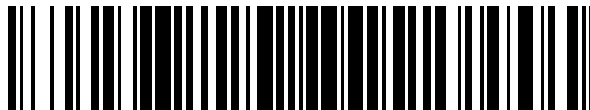


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 990**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2016 PCT/US2016/042207**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2017 WO17011626**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2016 E 16745002 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3322969**

54 Título: **Sistema y método para ajustar las mediciones de citometría**

30 Prioridad:

15.07.2015 US 201562192997 P

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

06.11.2020

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

XU, HENG

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 791 990 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

Sistema y método para ajustar las mediciones de citometría

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 [0001] Esta descripción se refiere en general al campo de la citometría de flujo, y más en concreto a los métodos para reducir el error en el análisis de muestras.

Descripción de la técnica relacionada

15 [0002] Los analizadores de partículas, como por ejemplo los citómetros de flujo y escaneado, son herramientas analíticas que permiten la caracterización de partículas basándose en parámetros ópticos como la dispersión de luz y la fluorescencia. En un citómetro de flujo, por ejemplo, partículas tales como moléculas, microesferas unidas por analitos o células individuales, en una suspensión de fluido pasan a través de una región de detección en la que las partículas se exponen a una luz de excitación, normalmente procedente de uno o más láseres, y se miden las propiedades de dispersión de luz y fluorescencia de las partículas. Los marcadores, como por ejemplo
20 los componentes de las proteínas de la superficie celular de las células, cuya presencia puede servir como una característica distintiva, pueden ser reconocidos por reactivos que incluyen colorantes fluorescentes para facilitar la detección, identificación y caracterización. Cada reactivo puede incluir una etiqueta, normalmente una molécula fluorescente o "colorante", conjugada con una molécula detectora que se unirá selectivamente a un marcador específico, por ejemplo un anticuerpo monoclonal. Se puede distinguir una multiplicidad de partículas o componentes
25 diferentes usando colorantes fluorescentes espectralmente distintos para etiquetar los marcadores. En algunas implementaciones, se incluyen una multiplicidad de fotodetectores en el analizador. Cuando una partícula atraviesa el haz de láser, se producirán pulsos correlacionados en el tiempo en detectores de dispersión frontal (FSC por sus siglas en inglés, *forward scatter*) y dispersión lateral (SSC por sus siglas en inglés, *side scatter*), y posiblemente también en detectores de emisión fluorescente. Esto constituye un "evento", y para cada evento se almacena la magnitud de la salida del detector para cada detector, es decir los detectores de FSC, SSC y emisión fluorescente. Los datos obtenidos comprenden las señales medidas para cada uno de los parámetros de dispersión de luz y las emisiones de fluorescencia.

35 [0003] Los citómetros pueden comprender además componentes para almacenar las salidas de los detectores y analizar los datos. Por ejemplo, el almacenamiento y análisis de datos puede llevarse a cabo utilizando un ordenador conectado al equipo electrónico de detección. Por ejemplo, los datos pueden almacenarse lógicamente en una forma tabular, donde cada fila corresponde a datos para una partícula (o un evento), y las columnas corresponden a cada uno de los parámetros medidos. El uso de formatos de archivo estándar, como el formato de archivo "FCS" (Estándar de Citometría de Flujo, por sus siglas en inglés, *Flow Cytometry Standard*), para almacenar datos procedentes de un
40 citómetro de flujo, facilita el análisis de datos utilizando programas y/o máquinas independientes. Usando los métodos de análisis actuales, los datos generalmente se muestran en diagramas bidimensionales (2D) para facilitar la visualización, pero se pueden usar otros métodos para visualizar datos multidimensionales.

45 [0004] Los parámetros medidos usando un citómetro de flujo incluyen normalmente la FSC, que se refiere a la luz de excitación que se dispersa en un sentido generalmente hacia delante o frontal al incidir en la partícula, la SSC, que se refiere a la luz de excitación que se dispersa en un sentido generalmente lateral al incidir en la partícula, y la luz emitida por moléculas fluorescentes en uno o más canales (bandas de frecuencia) del espectro, denominados FL1, FL2, etc., o por el nombre del colorante fluorescente que emite principalmente en ese canal. Se pueden identificar diferentes tipos de células mediante los parámetros de dispersión y las emisiones de fluorescencia resultantes de
50 etiquetar varias proteínas celulares con anticuerpos etiquetados con colorante.

[0005] Los citómetros de flujo y de escaneado están disponibles comercialmente, por ejemplo, en BD Biosciences (San José, California, Estados Unidos de América). La citometría de flujo se describe en, por ejemplo, Landy *et al.* (eds.), *Clinical Flow Cytometry*, Annals of the New York Academy of Sciences Volume 677 (1993); Bauer *et al.* (eds.), *Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications*, Williams & Wilkins (1993); Ormerod (ed.), *Flow Cytometry: A Practical Approach*, Oxford Univ. Press (1997); Jaroszeski *et al.* (eds.), *Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology* No. 91, Humana Press (1997); y Practical Shapiro, *Flow Cytometry*, 4.^a ed., Wiley-Liss (2003); la totalidad de esta bibliografía se incorpora al presente documento como referencia. La microscopía de imagen de fluorescencia se describe, por ejemplo, en Pawley (ed.), *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2.^a edición, Plenum Press (1989).
60

[0006] Un aspecto importante en la técnica de citometría de flujo es el análisis de datos de medición. Los ejemplos de procesamiento de datos utilizados para mejorar la precisión de las mediciones de citometría de flujo se describen en la bibliografía de patentes, por ejemplo, EP1431745A1, US2015140577A1 y US2014309782A1.
65

RESUMEN

[0007] De acuerdo con la presente invención, se dan a conocer métodos y aparatos para experimentos de citometría de flujo, tal y como se describen en las reivindicaciones.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0008] La Figura 1 representa un citómetro de flujo de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención.

10 La Figura 2 representa un gráfico en el que se muestran ejemplos de los espectros de emisión de etiquetas y las ventanas de filtro de fotodetectores de acuerdo con la presente invención.

La Figura 3 representa un ejemplo de un diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral en 2-D en el que se muestran las intensidades de dispersión frontal y dispersión lateral para varias poblaciones celulares de acuerdo con la presente invención.

15 La Figura 4 representa un ejemplo de un histograma en el que se muestran los espectros de autofluorescencia promediados de varias poblaciones celulares de acuerdo con la presente invención.

La Figura 5 representa un ejemplo de varias regiones de diagrama de acuerdo con la presente invención.

La Figura 6A representa un ejemplo de un mapa de intensidad de autofluorescencia de acuerdo con la presente invención.

20 La Figura 6B representa un ejemplo de un mapa de densidad de eventos de acuerdo con la presente invención.

La Figura 7A representa un ejemplo de un diagrama de dispersión frontal-lateral de una muestra teñida de acuerdo con la presente invención.

La Figura 7B representa un ejemplo de un diagrama de puntos que muestra la intensidad de dispersión lateral y la intensidad de fluorescencia medida de una etiqueta para la muestra teñida de la Figura 6A.

25 La Figura 7C representa un ejemplo de un diagrama de puntos que muestra los datos de la Figura 6B después de eliminar las señales de ruido de autofluorescencia de acuerdo con la presente invención.

La Figura 8 representa un ejemplo de un diagrama de puntos de dispersión frontal-dispersión lateral para una muestra sin teñir escalada superpuesto a un diagrama de puntos de dispersión frontal-dispersión lateral para una muestra teñida de acuerdo con la presente invención.

30 La Figura 9 representa un diagrama de flujo de un proceso para operar un citómetro de flujo de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

35 [0009] La presente invención proporciona sistemas y métodos para llevar a cabo experimentos de citometría de flujo. En los últimos años se han deseado incrementos en el número de mediciones realizadas para los eventos de un experimento de citometría de flujo, y los fabricantes de instrumentos han desarrollado instrumentos de citometría de flujo con sistemas de detección y capacidades de análisis de datos de mayor complejidad y rendimiento. Los avances en bioquímica han posibilitado una selección cada vez mayor de etiquetas fluorescentes. Aunque estos avances han hecho que la citometría de flujo resulte más útil que nunca, aprovecharse de esa utilidad aún puede constituir un reto. La selección de etiquetas y la configuración de instrumentos son más complejas, mientras que al mismo tiempo el éxito experimental depende más de un diseño experimental apropiado. Por ejemplo, la elección de los colorantes fluorescentes utilizados en un experimento de citometría es significativa para la precisión de las conclusiones extraídas de los datos medidos porque los espectros de emisión de un colorante fluorescente pueden superponerse a las bandas de detección de múltiples detectores. Las diferencias en el brillo relativo entre las etiquetas y las diferencias en la densidad relativa de los marcadores etiquetados en un experimento también pueden afectar la precisión de la caracterización del evento.

50 [0010] En la Figura 1 se muestra un sistema 100 para citometría de flujo de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención. El sistema 100 incluye un citómetro de flujo 110, un controlador/procesador 190 y una memoria 195. El citómetro de flujo 110 incluye uno o más láseres de excitación 115a-c, una lente de enfoque 120, una cámara de flujo 125, un detector de dispersión frontal (FSC) 130, un detector de dispersión lateral (SSC) 135, una lente de recolección de fluorescencia 140, uno o más divisores de haz 145a-g, uno o más filtros de paso de banda 150a-e, uno o más filtros *Long pass* ("LP") 155a-b, y uno o más detectores de emisión fluorescente 160a-f.

55 [0011] Los láseres de excitación 115a-c emiten luz en forma de haz láser. Las longitudes de onda de los haces láser emitidos por los láseres de excitación 115a-c son 488 nm, 633 nm y 325 nm, respectivamente, en el ejemplo de sistema de la Figura 1. Los haces láser se dirigen primero a través de uno o más de los divisores de haz 145a y 145b. El divisor de haz 145a transmite luz a 488 nm y refleja la luz a 633 nm. El divisor de haz 145b transmite luz UV (luz con una longitud de onda en el rango de 10 a 400 nm) y refleja la luz a 488 nm y 633 nm.

60 [0012] Los haces láser son dirigidos después a una lente de enfoque 120, la cual enfoca los haces a la parte de una corriente de fluido donde están ubicadas las partículas de una muestra, dentro de la cámara de flujo 125. La cámara de flujo forma parte de un sistema fluido que dirige las partículas, normalmente de una en una, en una corriente hacia el haz láser enfocado para ser analizadas. La cámara de flujo puede comprender una celda de flujo en un citómetro de sobremesa o una extremidad de boquilla en un citómetro de flujo de aire.

[0013] La luz del haz o haces láser interactúa con las partículas en la muestra por difracción, refracción, reflexión, dispersión y absorción con reemisión en varias longitudes de onda diferentes dependiendo de las características de la partícula, por ejemplo su tamaño, estructura interna y la presencia de una o más moléculas fluorescentes unidas o presentes de forma natural en la partícula. Las emisiones de fluorescencia, así como la luz difractada, la luz refractada, la luz reflejada y la luz dispersada pueden dirigirse a uno o varios del detector de dispersión frontal 130, el detector de dispersión lateral 135 y el detector o detectores de emisión fluorescente 160a-f a través de uno o más de los divisores de haz 145a-g, los filtros de paso de banda 150a-e, los filtros *Long pass* 155a-b y la lente de recolección de fluorescencia 140.

[0014] La lente de recolección de fluorescencia 140 recoge la luz emitida por la interacción del haz de láser y las partículas, y dirige esa luz hacia uno o más divisores y filtros de haz. Los filtros de paso de banda, como por ejemplo los filtros de paso de banda 150a-e, permiten que un rango estrecho de longitudes de onda pase a través del filtro. Por ejemplo, el filtro de paso de banda 150a es un filtro 510/20. El primer número representa el centro de una banda espectral. El segundo número proporciona un rango de la banda espectral. Por lo tanto, un filtro 510/20 se extiende 10 nm a cada lado del centro de la banda espectral, o desde 500 nm a 520 nm. Los filtros de paso corto transmiten longitudes de onda de luz iguales o más cortas que una longitud de onda especificada. Los filtros *Long pass*, por ejemplo los filtros *Long pass* 155a-b, transmiten longitudes de onda de luz iguales o más largas que una longitud de onda de luz especificada. Por ejemplo, el filtro *Long pass* 155a, que es un filtro *Long pass* de 670 nm, transmite luz igual o superior a 670 nm. Los filtros a menudo se seleccionan para optimizar la especificidad de un detector para un colorante fluorescente particular. Los filtros pueden configurarse de modo que la banda espectral de luz transmitida al detector se encuentre cerca del pico de emisión de un colorante fluorescente.

[0015] Los divisores de haz dirigen la luz de diferentes longitudes de onda en diferentes direcciones. Los divisores de haz se pueden caracterizar por propiedades de filtro como paso corto y paso largo. Por ejemplo, el divisor de haz 145g es un divisor de haz 620 SP, lo que significa que el divisor de haz 145g transmite longitudes de onda de luz que son 620 nm o más cortas y refleja longitudes de onda de luz que son más largas que 620 nm en una dirección diferente. En una realización, los divisores de haz 145a-g pueden comprender espejos ópticos, como por ejemplo espejos dicróicos.

[0016] El detector de dispersión frontal 130 está colocado ligeramente fuera del eje del haz directo que atraviesa la celda de flujo y está configurado para detectar luz difractada, la luz de excitación que se desplaza a través o alrededor de la partícula en una dirección principalmente frontal. La intensidad de la luz detectada por el detector de dispersión frontal depende del tamaño total de la partícula. El detector de dispersión frontal puede incluir un fotodiodo. El detector de dispersión lateral 135 está configurado para detectar la luz refractada y reflejada de las superficies y estructuras internas de la partícula, y tiende a aumentar a medida que se incrementa la complejidad de la estructura de la partícula. Las emisiones de fluorescencia de las moléculas fluorescentes asociadas con la partícula pueden detectarse mediante uno o más detectores de emisión fluorescente 160a-f. El detector de dispersión lateral 135 y los detectores de emisión fluorescente pueden incluir tubos fotomultiplicadores. Las señales detectadas en el detector de dispersión frontal 130, el detector de dispersión lateral 135 y los detectores de emisión fluorescente pueden ser convertidas en señales electrónicas (voltajes) por los detectores. Estos datos pueden proporcionar información sobre la muestra.

[0017] Un experto en la materia reconocerá que un citómetro de flujo de acuerdo con una realización de la presente invención no está limitado al citómetro de flujo representado en la Figura 1, sino que puede incluir cualquier citómetro de flujo conocido en la técnica. Por ejemplo, un citómetro de flujo puede tener cualquier número de láseres, divisores de haz, filtros y detectores en diversas longitudes de onda y en diversas configuraciones diferentes.

[0018] Durante su funcionamiento, la operación del citómetro es controlada por un controlador/procesador 190 y los datos de medición de los detectores pueden ser almacenados en la memoria 195 y procesados por el controlador/procesador 190. Aunque no se muestra explícitamente, el controlador/procesador 190 está acoplado a los detectores para recibir las señales de salida de los mismos, y también puede estar acoplado a componentes eléctricos y electromecánicos del citómetro de flujo 100 para controlar los láseres, los parámetros de flujo de fluido y similares. También se pueden proporcionar capacidades de entrada/salida (E/S) 197 en el sistema. La memoria 195, el controlador/procesador 190 y la E/S 197 pueden proporcionarse por completo como parte integral del citómetro de flujo 110. En dicha realización, una pantalla también puede formar parte de las capacidades de E/S 197 para presentar datos experimentales a los usuarios del citómetro 100. Alternativamente, parte o la totalidad de la memoria 195 y el controlador/procesador 190 y las capacidades de E/S pueden formar parte de uno o más dispositivos externos, por ejemplo un ordenador de uso general. En algunas realizaciones, parte o la totalidad de la memoria 195 y el controlador/procesador 190 pueden estar en comunicación inalámbrica o alámbrica con el citómetro 110. El controlador/procesador 190, junto con la memoria 195 y la E/S 197, pueden configurarse para realizar diversas funciones relacionadas con la preparación y el análisis de un experimento de citómetro de flujo.

[0019] El sistema de la Figura 1 incluye seis detectores diferentes que detectan luz fluorescente en seis bandas de longitud de onda diferentes (que pueden denominarse en el presente documento una "ventana de filtro" o un "canal de fluorescencia" con respecto a un detector determinado), tal y como se definen por la configuración de filtros y/o

divisores en la trayectoria del haz desde la celda de flujo 125 hasta cada detector. Las diferentes moléculas fluorescentes utilizadas para un experimento de citómetro de flujo emitirán luz en sus propias bandas características de longitud de onda. Las etiquetas fluorescentes específicas utilizadas para un experimento y sus bandas de emisión fluorescente asociadas pueden seleccionarse para que coincidan generalmente con las ventanas de filtro de los detectores. Sin embargo, a medida que se proporcionan más detectores y se utilizan más etiquetas, no es posible una correspondencia perfecta entre ventanas de filtro y espectros de emisión fluorescente. En general, es cierto que, aunque el pico de los espectros de emisión de una molécula fluorescente específica puede encontrarse dentro de la ventana de filtro de un detector en particular, algunos de los espectros de emisión de esa etiqueta también se superpondrán a las ventanas de filtro de uno o más de los otros detectores. Esto se puede denominar desbordamiento (en inglés, *spillover*).

[0020] La E/S 197 puede configurarse para recibir datos con respecto a un experimento de citómetro de flujo que tiene un panel de etiquetas fluorescentes y una pluralidad de poblaciones celulares que tienen una pluralidad de marcadores, y cada población celular tiene un subconjunto de la pluralidad de marcadores. La E/S 197 también puede configurarse para recibir datos biológicos asignando uno o más marcadores a una o más poblaciones de células, datos de densidad de marcadores, datos de espectro de emisión, etiquetas de asignación de datos a uno o más marcadores y datos de configuración del citómetro. Los datos del experimento del citómetro de flujo, como las características espectrales de la etiqueta y los datos de configuración del citómetro de flujo también pueden almacenarse en la memoria 195. El controlador/procesador 190 puede configurarse para evaluar una o más asignaciones de etiquetas a los marcadores.

[0021] En la Figura 2 se muestra un ejemplo ilustrativo de desbordamiento causado por la superposición de espectros de emisiones para diferentes etiquetas. En la Figura 2 se muestran los espectros de emisión de marcadores etiquetados con FITC (isotiocianato de fluoresceína, por sus siglas en inglés, *Fluorescein IsoTioCyanate*), representados por la curva que se extiende desde una longitud de onda de aproximadamente 475 nm a 650 nm, y la ventana de filtro para un "detector de FITC". Uno o más filtros, como por ejemplo el filtro de paso de banda 150b que se muestra en la Figura 1, pueden ser colocados delante del detector, limitando el rango de longitudes de onda que puede alcanzar al detector y el rango de longitudes de onda que constituye una ventana de filtro. La ventana de filtro para el detector de FITC es 530/30, lo que quiere decir que la ventana de filtro se extiende desde 515 nm hasta 545 nm. La ventana de filtro de FITC está representada por el rectángulo sombreado que se extiende desde 515 nm hasta 545 nm. En la Figura 2 también se muestran los espectros de emisión de marcadores etiquetados con PE (ficoeritrina, por sus siglas en inglés, *phycoerythrin*) representados por la curva que se extiende desde aproximadamente 525 nm hasta aproximadamente 725 nm. Uno o más filtros, como por ejemplo el filtro de paso de banda 150c que se muestra en la Figura 1, pueden colocarse delante del detector. La ventana de filtro para el detector de PE es 585/42, lo que quiere decir que la ventana de filtro se extiende desde 564 nm hasta 606 nm. La ventana de filtro de PE está representada por el rectángulo sombreado que se extiende desde 564 nm hasta 606 nm. En la Figura 2 se ilustra que una parte de los espectros de emisiones para FITC se superpone a la ventana de filtro para el detector de PE, etiquetado como "desbordamiento de FITC en PE". Por lo tanto, parte de la emisión de fluorescencia de la etiqueta FITC es detectada en el detector de PE y medida junto con la emisión de fluorescencia de la etiqueta PE. El desbordamiento puede hacer que se extraigan conclusiones erróneas con respecto a la abundancia de etiquetas presentes en una partícula. Este problema puede ser especialmente grave para los usos recientes de los citómetros de flujo, ya que se utilizan más etiquetas y detectores, lo que reduce la separación de los picos de fluorescencia y las ventanas de filtro. Debido también al creciente número de etiquetas fluorescentes disponibles (generalmente, un experimentador dispone de docenas de opciones), con una variedad de longitudes de onda máximas, intensidades y energías de emisión, y características de anchura espectral, la variedad de densidades de marcadores en las células que se están caracterizando, así como en algunos casos las ventanas de filtro seleccionables, resulta muy difícil diseñar una configuración adecuada para un experimento de citómetro de flujo. Una complicación adicional es la autofluorescencia de las células u otras partículas que se están caracterizando. Esta señal de autofluorescencia también se superpondrá a una o más ventanas de filtro, lo que causará ruido en las mediciones. La señal de ruido de autofluorescencia puede depender también del tipo de partícula/célula que se está analizando.

[0022] La señal capturada en un detector de emisión fluorescente puede comprender contribuciones de una o más etiquetas fluorescentes, una señal de fondo del sistema y la señal de ruido de autofluorescencia. El fondo del sistema, a menudo denominado "línea de base", puede eliminarse de una señal medida a través de un proceso de restauración de línea de base, en el que se puede estimar una señal de línea de base a partir de intervalos de tiempo en un experimento de citometría en el que no se produce ningún evento y luego se sustrae de la señal medida. Para compensar la autofluorescencia, en las técnicas de compensación convencionales se puede medir una muestra "negativa" o sin teñir, y una muestra "positiva", la cual contiene células teñidas con un solo colorante, para cada colorante fluorescente que se utilizará en un experimento de citometría. Se puede definir una única población negativa global a partir de una muestra sin teñir para cada colorante. La mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI por sus siglas en inglés, *median fluorescence intensity*) de la población negativa global única puede tratarse como la señal de ruido de autofluorescencia de la muestra y puede sustraerse de los datos de la muestra positiva para calcular un valor de desbordamiento de autofluorescencia. Sin embargo, cuando un marcador de interés se expresa en más de un tipo de célula en una muestra, el método convencional puede no eliminar con precisión la señal de ruido de autofluorescencia porque la señal de ruido de autofluorescencia de cada tipo de célula puede variar en intensidad. En consecuencia, la autofluorescencia puede caracterizarse erróneamente como la emisión de fluorescencia de uno

o más marcadores, incluso en ausencia de dichos marcadores en un tipo de célula determinado. Esta caracterización errónea puede hacer que sea difícil distinguir las poblaciones que no expresan un marcador particular y aquellas que tienen una expresión débil de ese marcador.

5 [0023] De acuerdo con las realizaciones descritas en el presente documento, la estimación de la señal de ruido de autofluorescencia puede adaptarse a las características de dispersión celular. Las células con un tamaño y complejidad similares tienen más probabilidades de tener una autofluorescencia similar. Puesto que el tamaño y la complejidad de una partícula pueden correlacionarse con la intensidad medida por los detectores de dispersión frontal y los detectores de dispersión lateral, respectivamente, la estimación de una señal de ruido de autofluorescencia para un área pequeña de un diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral puede tener como consecuencia un valor más preciso que la estimación de la señal de ruido de autofluorescencia basada en una intensidad de fluorescencia mediana única. Se pueden usar las mediciones de intensidad de dispersión frontal y de dispersión lateral junto con los valores de intensidad de fluorescencia asociados para proporcionar una pluralidad de señales de ruido de autofluorescencia estimadas, estando cada señal asociada con un área de un diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral. A continuación, se pueden sustraer los valores estimados de la señal de ruido de autofluorescencia de las señales capturadas por los detectores de emisión fluorescente para una muestra teñida correspondiente basándose, al menos en parte, en las áreas del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral asociadas con las señales de ruido de autofluorescencia, de forma que los datos medidos se correlacionen más directamente con los marcadores y etiquetas de interés.

20 [0024] En la Figura 3 se muestra un ejemplo ilustrativo de un diagrama de puntos de dispersión frontal-dispersión lateral en 2-D. Las mediciones correlacionadas de la intensidad de dispersión frontal y la intensidad de dispersión lateral pueden permitir la diferenciación de los tipos celulares en una población celular heterogénea. Cada evento en un experimento de citómetro de flujo tiene una posición en el diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral basado en los valores medidos por los detectores de dispersión frontal y dispersión lateral. Por lo tanto, cada punto que se muestra en la Figura 3 es representativo de las mediciones de dispersión frontal y dispersión lateral de uno o más eventos. Es probable que las células del mismo tipo tengan medidas similares de dispersión frontal y dispersión lateral, lo que quiere decir que los grupos de puntos de datos en un diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral en 2-D pueden ser representativos de una sola población celular. En la Figura 3 se muestra un diagrama de puntos de dispersión frontal-dispersión lateral para una muestra sin teñir que contiene una pluralidad de poblaciones celulares, linfocitos, monocitos y granulocitos, medidos utilizando un citómetro de flujo. Los puntos de datos que representan las mediciones de linfocitos se muestran en rojo. Los puntos de datos que representan las mediciones de monocitos se muestran en verde. Los puntos de datos que representan las mediciones de granulocitos se representan en azul. Los puntos de datos que representan las mediciones de linfocitos están etiquetados como "Linfocitos". Los puntos de datos que representan las mediciones de monocitos están etiquetados como "Monocitos". Los puntos de datos que representan las mediciones de granulocitos están etiquetados como "Granulocitos". Los colores, así como los contornos dibujados alrededor de cada población, se muestran solo con fines ilustrativos.

35 [0025] En la Figura 4 se muestra un ejemplo ilustrativo de un histograma que representa los espectros de autofluorescencia promediados de linfocitos, monocitos y granulocitos medidos a partir de una muestra sin teñir en el rango de 400-800 nm usando un citómetro de flujo. Como se representa en la Figura 4, los valores de intensidad de autofluorescencia son diferentes para cada población celular y la diferencia varía a través de los canales de fluorescencia. Como se ha descrito anteriormente, las mediciones de intensidad de dispersión frontal y de dispersión lateral para una muestra sin teñir que contiene una pluralidad de tipos de células, como las mediciones que se muestran para los linfocitos, monocitos y granulocitos en la Figura 3, pueden usarse junto con los valores de intensidad de fluorescencia asociados, como por ejemplo los representados en la Figura 4, para proporcionar una pluralidad de señales de ruido de autofluorescencia estimadas, estando cada señal asociada con una región de un diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral.

40 [0026] Las regiones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral pueden correlacionarse con uno o más valores de intensidad de autofluorescencia basándose al menos en parte en las mediciones para los eventos de la muestra sin teñir. En una realización, las regiones de diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral pueden incluir un conjunto de rangos no superpuestos de valores de intensidad de dispersión frontal y valores de intensidad de dispersión lateral. El valor de intensidad de autofluorescencia asociado con una región de diagrama puede incluir una mediana o un promedio de la intensidad medida asociada con eventos de la muestra sin teñir ubicada en la región de diagrama. En la Figura 5 se muestra un ejemplo ilustrativo de varias regiones de diagrama: la región 510, la región 520 y la región 530. Cada región de diagrama puede asociarse con un valor de intensidad de autofluorescencia para cada canal de fluorescencia. Por ejemplo, pasar una muestra sin teñir a través del citómetro de flujo representado en la Figura 1 puede tener como resultado seis valores de intensidad de autofluorescencia asociados con cada región de diagrama, uno para cada uno de los seis detectores de emisión fluorescente. Para el detector de emisión de fluorescencia 160a de la Figura 1, correspondiente a un canal de fluorescencia FL1, existe un valor de intensidad de autofluorescencia δ_1 asociado con la región de diagrama 510, un valor de intensidad de autofluorescencia α_1 asociado con la región de diagrama 520 y un valor de intensidad de autofluorescencia β_1 asociado con la región de diagrama 530. Para el detector de emisión de fluorescencia 160b de la Figura 1, correspondiente a un canal de fluorescencia FL2, hay un valor de intensidad de autofluorescencia δ_2 asociado con la región de diagrama 510, un valor de intensidad de autofluorescencia α_2 asociado con la región de diagrama 520 y un valor de intensidad de

autofluorescencia β_2 asociado con la región de diagrama 530. Los detectores de emisión fluorescente 160c-f pueden tener cada uno también un valor de intensidad de autofluorescencia asociado con cada región de diagrama. En algunas realizaciones, las regiones de diagrama pueden ser de forma cuadrada. Las dimensiones de las regiones de diagrama pueden seleccionarse basándose al menos en parte en la densidad de eventos en diferentes ubicaciones en el diagrama de eventos de dispersión frontal-dispersión lateral. En consecuencia, las regiones de diagrama para una única muestra sin teñir pueden ser de varios tamaños diferentes. Por ejemplo, una región de diagrama en una ubicación con una alta densidad de eventos puede ser más reducida que una región de diagrama en una ubicación con una densidad de eventos relativamente baja.

[0027] En una realización, los valores de intensidad de fluorescencia medidos para una muestra sin teñir están asociados con las mediciones de intensidad de dispersión frontal y dispersión lateral a través de un mapa de intensidad de autofluorescencia. En la Figura 6B se muestra un ejemplo ilustrativo de un mapa de densidad de eventos. En la Figura 6A se muestra el mapa de intensidad de autofluorescencia derivado de los eventos de la Figura 6B. Un mapa de intensidad de autofluorescencia muestra la intensidad de fluorescencia medida en un canal de fluorescencia para intensidades de dispersión frontal y dispersión lateral determinadas. El mapa se puede configurar de manera que cada ubicación de dispersión frontal-dispersión lateral se asocie con una región de diagrama. Cada región de diagrama puede correlacionarse con la intensidad de autofluorescencia mediana o promedio de los eventos en esa región.

[0028] Los valores de intensidad de autofluorescencia mediana o promedio medidos para una muestra sin teñir en una región seleccionada de un diagrama FSC-SSC pueden ser sustraídos de las mediciones de intensidad de fluorescencia para una muestra teñida que se encuentra en la misma región seleccionada del diagrama FSC-SSC para compensar la señal de ruido de autofluorescencia en los datos medidos. Para cada evento medido para una muestra teñida, la ubicación de dispersión frontal-dispersión lateral del evento puede correlacionarse con una región de dispersión frontal-dispersión lateral para la muestra sin teñir, y a continuación se puede encontrar un valor de intensidad de autofluorescencia para esa región, por ejemplo, mediante el uso de un mapa de intensidad de autofluorescencia como el mapa ilustrado en la Figura 6A, el cual puede almacenarse como una tabla de búsqueda u otro formato de datos. El valor de intensidad de autofluorescencia en la región de dispersión frontal-dispersión lateral correspondiente a continuación puede ser sustraído de la intensidad medida de la muestra teñida en la ubicación del diagrama asociado. Por ejemplo, por lo que respecta a la Figura 5, si un evento es medido para una muestra teñida y la ubicación de dispersión frontal-dispersión lateral del evento se correlaciona con la región de diagrama 510, puede compensarse el efecto de la señal de ruido de autofluorescencia en los datos medidos sustrayendo el valor de intensidad de autofluorescencia asociado con esa región para cada detector del valor de intensidad medido para la muestra teñida en cada detector, respectivamente. Por consiguiente, el valor de intensidad de autofluorescencia δ_1 puede ser sustraído de un valor de intensidad medido para el evento en el detector de emisiones fluorescentes 160a y el valor de intensidad de autofluorescencia δ_2 puede ser sustraído de un valor de intensidad medido para el evento en el detector de emisiones fluorescentes 160b. Los valores de intensidad medidos para el evento en los detectores de emisiones fluorescentes 160c-f también pueden ser sustraídos de los valores de intensidad de autofluorescencia asociados con la región 510 para esos detectores.

[0029] Las Figuras 7A-C muestran un ejemplo ilustrativo de un conjunto de diagramas de puntos procesados de conformidad con los principios anteriores. La Figura 7A representa un diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral de una muestra teñida con BV510, un colorante fluorescente que puede utilizarse como etiqueta para marcadores CD4. Los puntos de datos en la muestra se muestran con un contorno y en color con fines ilustrativos, con los linfocitos en rojo, los monocitos en verde y los granulocitos en azul. En la Figura 7A, los linfocitos, monocitos y granulocitos están etiquetados como "Linfocitos", "Monocitos" y "Granulocitos", respectivamente. En la Figura 7B se muestra un diagrama de puntos que representa la intensidad de dispersión lateral y la intensidad de fluorescencia medida de BV510 para la muestra de la Figura 7A usando un análisis de datos convencional. Como se ilustra en la Figura 7B, existen valores de intensidad medidos para las poblaciones de linfocitos, monocitos y granulocitos, lo que implica que CD4 se expresa en cada una de esas poblaciones. La Figura 7C muestra un diagrama de puntos que representa los datos de la Figura 7B después de eliminar las señales de ruido de autofluorescencia de conformidad con la presente invención. Después de la eliminación, las células sin expresión deben tener valores medios de intensidad de fluorescencia cercanos a cero. En la Figura 7C se muestran dos grupos de linfocitos, un primer grupo con valores de intensidad medidos cercanos a cero y un segundo grupo de linfocitos con valores de intensidad medidos entre 10^4 y 10^5 . La mayoría de los granulocitos también tienen valores de intensidad medidos cercanos a cero. En consecuencia, se puede concluir que los linfocitos del primer grupo y la mayoría de los granulocitos no expresan CD4.

[0030] Cuando se ensamblan las intensidades de autofluorescencia para las regiones FSC-SSC sin teñir, la diferencia de ganancia de dispersión entre las mediciones de muestras teñidas y sin teñir puede conducir a diferentes ubicaciones de eventos FSC-SSC para los mismos tipos de células entre experimentos teñidos y sin teñir. Esto puede causar correlaciones incorrectas entre las ubicaciones de dispersión frontal-dispersión lateral de uno o más eventos de la muestra teñida y las regiones de dispersión frontal-dispersión lateral de la muestra sin teñir. En algunas realizaciones, las ubicaciones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral de los eventos medidos en la muestra sin teñir pueden ajustarse basándose al menos en parte en una comparación entre los eventos medidos para la muestra sin teñir y los eventos medidos para la muestra teñida. La escala de las mediciones de dispersión frontal-dispersión lateral para una muestra sin teñir puede ajustarse de modo que el patrón de densidad de dispersión

coincida mejor con el de la muestra teñida. Un ejemplo ilustrativo de dicho ajuste se representa en la Figura 8. La Figura 8 muestra la superposición de un diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral sin teñir ajustado (en rojo) al diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral de una muestra teñida (que se muestra en negro). Dicho ajuste puede realizarse, por ejemplo, aplicando un factor de escala a los datos de la muestra sin teñir.

5 [0031] En una realización, la determinación de un factor de escala incluye la conversión de los diagramas de dispersión frontal-dispersión lateral de la muestra teñida y sin teñir a imágenes en escala de grises basadas en la densidad. Se puede realizar la apertura de la imagen morfológica para eliminar los objetos pequeños, es decir, los puntos dispersos. Se puede crear un umbral con las imágenes resultantes para crear imágenes binarias. A
10 continuación, se puede determinar una o más de las regiones conectadas más grandes para cada imagen, y se pueden calcular los centroides para una o más regiones. Después se puede calcular un factor de escala utilizando la relación entre las posiciones del centroide en cada dimensión de la imagen sin teñir y la imagen teñida. Se pueden ajustar los datos de dispersión frontal-dispersión lateral utilizando el factor de escala determinado.

15 [0032] En la Figura 9 se muestra un diagrama de flujo de una realización de un proceso 900 de operación de un citómetro de flujo de acuerdo con una realización de la presente invención. El proceso 900 comienza en un paso 910, en donde se miden uno o más valores de dispersión frontal, uno o más valores de dispersión lateral y uno o más valores de intensidad de fluorescencia para uno o más eventos de una muestra sin teñir usando un citómetro de flujo, como por ejemplo el citómetro de flujo 110 que se muestra en la Figura 1. El valor o valores de dispersión frontal, uno
20 o más valores de dispersión lateral y uno o más valores de intensidad de fluorescencia pueden medirse mediante uno o más detectores, como por ejemplo el detector de dispersión frontal 130, el detector de dispersión lateral 135 y los detectores de emisión fluorescente 160a-f.

25 [0033] Después de medir los valores de dispersión frontal, de dispersión lateral y de intensidad de fluorescencia para los eventos de la muestra sin teñir, el proceso 900 avanza al paso 920, en donde uno o más valores de intensidad de fluorescencia están asociados con una o más regiones de diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral basándose al menos en parte en las mediciones tomadas para la muestra sin teñir. Los valores de intensidad de fluorescencia pueden asociarse con las regiones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral mediante un circuito de procesamiento, como por ejemplo el controlador/procesador 190 que se muestra en la Figura 1. En la
30 Figura 3 se muestra un ejemplo de un diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral de acuerdo con una realización de la presente invención. Los valores de intensidad de fluorescencia pueden asociarse con una o más regiones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral en un mapa de intensidad de autofluorescencia, como por ejemplo el mapa de intensidad de autofluorescencia mostrado en las Figuras 6A.

35 [0034] Después de que los valores de intensidad de fluorescencia se asocian con las regiones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral, el proceso 900 avanza al paso 930, en donde uno o más valores de dispersión frontal, uno o más valores de dispersión lateral y uno o más valores de intensidad de fluorescencia se miden para uno o más eventos de una muestra teñida utilizando el citómetro de flujo. La muestra teñida puede teñirse con un solo colorante fluorescente y puede ser del mismo donante que la muestra sin teñir.

40 [0035] Después de medir los valores de dispersión frontal, dispersión lateral e intensidad de fluorescencia para los eventos de la muestra teñida, el proceso 900 avanza al paso 940, en donde el procesador determina las ubicaciones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral para el evento o eventos de la muestra teñida.

45 [0036] Después de determinar las ubicaciones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral, el proceso 900 avanza al paso 950, en donde, para cada uno de los eventos de la muestra teñida, el valor de intensidad de fluorescencia de la muestra sin teñir asociado con la región del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral que contiene la ubicación del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral del evento de la muestra teñida es sustraído del valor de intensidad de fluorescencia medido de la muestra teñida asociado con esa ubicación del diagrama de
50 dispersión frontal-dispersión lateral.

[0037] Tal y como se usan en el presente documento, los términos “determinar”, “determinando” o “determinación” abarcan una amplia variedad de acciones. Por ejemplo, el término “determinar” puede incluir calcular, computar, procesar, derivar, investigar, buscar (por ejemplo, buscar en una tabla, en una base de datos o en otra estructura de
55 datos), averiguar y similares. Además, el término “determinar” puede incluir recibir (por ejemplo, recibir información), acceder (por ejemplo, acceder a datos en una memoria) y similares. Asimismo, “determinar” puede incluir resolver, seleccionar, elegir, establecer y similares.

[0038] Tal y como se usan en el presente documento, los términos “proporcionar” o “proporcionando” abarcan una amplia variedad de acciones. Por ejemplo, el término “proporcionar” puede incluir almacenar un valor en una ubicación para su posterior recuperación, transmitir un valor directamente al destinatario, transmitir o almacenar una referencia a un valor y similares. “Proporcionar” también puede incluir codificar, decodificar, cifrar, descifrar, validar, verificar y
60 similares.

[0039] Tal y como se usa en el presente documento, una expresión que se refiere a “al menos uno de” una lista de elementos se refiere a cualquier combinación de esos elementos, incluidos los miembros individuales. Por ejemplo,

“al menos uno de: a, b o c” tiene como objetivo abarcar: a, b, c, a-b, a-c, b-c y a-b-c.

[0040] Los expertos en la materia entenderán que la información y las señales pueden representarse utilizando cualquiera de una variedad de tecnologías y técnicas diferentes. Por ejemplo, los datos, instrucciones, comandos, información, señales, bits, símbolos y chips a los que se puede hacer referencia en toda la descripción anterior pueden estar representados por voltajes, corrientes, ondas electromagnéticas, partículas o campos magnéticos, partículas o campos ópticos o cualquier combinación de los mismos.

[0041] Los expertos en la materia apreciarán además que los diversos bloques lógicos, módulos, circuitos y pasos de algoritmo ilustrativos descritos en relación con las realizaciones descritas en el presente documento pueden implementarse como hardware electrónico, software informático o combinaciones de ambos. Para ilustrar claramente esta intercambiabilidad de hardware y software, varios componentes, bloques, módulos, circuitos y pasos ilustrativos han sido descritos anteriormente generalmente en términos de su funcionalidad. Que dicha funcionalidad se implemente como hardware o software depende de la aplicación específica y de las restricciones de diseño impuestas en el sistema general. Los expertos en la materia pueden implementar la funcionalidad descrita de diferentes maneras para cada aplicación específica, pero estas decisiones de implementación no deben interpretarse como causas de una desviación con respecto al ámbito de la presente invención.

[0042] Las técnicas descritas en el presente documento pueden implementarse en hardware, software, firmware o en cualquier combinación de los mismos. Dichas técnicas pueden implementarse en cualquiera de una variedad de dispositivos, como por ejemplo ordenadores de uso general, dispositivos de comunicación inalámbrica o dispositivos de circuitos integrados que tienen múltiples usos, incluida la aplicación en dispositivos inalámbricos de comunicación y otros dispositivos. Todas las características descritas como módulos o componentes pueden implementarse conjuntamente en un dispositivo lógico integrado o independientemente como dispositivos lógicos discretos pero interoperables. Si se implementan en software, las técnicas pueden realizarse al menos en parte mediante un medio de almacenamiento de datos legible por ordenador que comprende un código de programa que incluye instrucciones que, cuando se ejecutan, realizan uno o más de los métodos descritos anteriormente. El medio de almacenamiento de datos legible por ordenador puede formar parte de un producto de programa informático, el cual puede incluir materiales de embalaje. El medio legible por ordenador puede comprender memoria o medios de almacenamiento de datos, como por ejemplo memoria de acceso aleatorio (RAM por sus siglas en inglés, *Random Access Memory*), memoria de acceso aleatorio dinámico síncrono (SDRAM por sus siglas en inglés, *Synchronous Dynamic Random-Access Memory*), memoria de solo lectura (ROM por sus siglas en inglés, *Read-Only Memory*), memoria de acceso aleatorio no volátil (NVRAM por sus siglas en inglés, *Non-Volatile Random Access Memory*), memoria de solo lectura programable y borrable eléctricamente (EEPROM por sus siglas en inglés, *Electrically Erasable Programmable Read-Only Memory*), memoria flash, medios de almacenamiento de datos magnéticos u ópticos, y similares. El medio legible por ordenador puede ser un medio de almacenamiento no transitorio. Las técnicas, adicionalmente o alternativamente, pueden implementarse al menos en parte mediante un medio de comunicación legible por ordenador que transporta o comunica el código de programa en forma de instrucciones o estructuras de datos y que un ordenador puede acceder, leer y/o ejecutar, como por ejemplo señales u ondas propagadas.

[0043] El código de programa puede ser ejecutado por un procesador, el cual puede incluir uno o más procesadores, como por ejemplo uno o más procesadores de señales digitales (DSP por sus siglas en inglés, *Digital Signal Processors*), microprocesadores de uso general, circuitos integrados para aplicaciones específicas (ASIC por sus siglas en inglés, *Application-Specific Integrated Circuits*), matrices lógicas de campo programables (FPGA por sus siglas en inglés, *Field Programmable Logic Arrays*) u otros circuitos lógicos integrados o discretos equivalentes. Dicho procesador puede configurarse para realizar cualquiera de las técnicas descritas en esta divulgación. Un procesador de uso general puede ser un microprocesador; pero, como alternativa, el procesador puede ser cualquier procesador, controlador, microcontrolador o máquina de estado convencional. Un procesador también puede implementarse como una combinación de dispositivos informáticos, por ejemplo una combinación de un DSP y un microprocesador, una pluralidad de microprocesadores, uno o más microprocesadores junto con un núcleo DSP o cualquier otra configuración de ese tipo. En consecuencia, el término “procesador”, tal y como se usa en el presente documento, puede referirse a cualquiera de las estructuras anteriores, a cualquier combinación de las estructuras anteriores o a cualquier otra estructura o aparato adecuados para la implementación de las técnicas descritas en el presente. Además, en algunos aspectos, la funcionalidad descrita en el presente puede proporcionarse dentro de módulos de software dedicados o módulos de hardware configurados para codificar y decodificar, o incorporarse en un codificador-decodificador de video combinado (códec).

[0044] Los métodos descritos en el presente comprenden uno o más pasos o acciones para lograr el método descrito.

[0045] Se han descrito diversas realizaciones de la invención. Estas realizaciones se encuentran dentro del ámbito de las reivindicaciones que se muestran a continuación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para operar un citómetro de flujo (110) que tiene un detector de dispersión frontal (130), un detector de dispersión lateral (135) y una pluralidad de detectores de emisión fluorescente (160a-f), correspondiendo cada detector de emisión fluorescente a un canal de fluorescencia, y que comprende:
 - la medición (910) de uno o más valores de dispersión frontal en el detector de dispersión frontal, uno o más valores de dispersión lateral en el detector de dispersión lateral y uno o más valores de intensidad de fluorescencia en uno o más de la pluralidad de detectores de emisión fluorescente para uno o más eventos de una muestra sin teñir usando el citómetro de flujo;
 - la asociación de uno o más valores de intensidad de fluorescencia para uno o más de la pluralidad de detectores de emisión fluorescente con una o más regiones de diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral basándose al menos en parte en la medición del evento o eventos de la muestra sin teñir;
 - la medición (930) de uno o más valores de dispersión frontal, uno o más valores de dispersión lateral y uno o más valores de intensidad de fluorescencia en uno o más de la pluralidad de detectores de emisión fluorescente para uno o más eventos de una muestra teñida usando el citómetro de flujo;
 - la determinación (940) de ubicaciones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral para el evento o eventos de la muestra teñida; y
 - para cada uno de los eventos de la muestra teñida, la sustracción (950) de un valor de intensidad de fluorescencia de la muestra sin teñir asociado con la región del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral que contiene la ubicación del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral del evento de la muestra teñida para al menos uno de la pluralidad de detectores de emisión fluorescente de un valor medido de intensidad de fluorescencia del evento de la muestra teñida en esa ubicación del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral medida en al menos uno de la pluralidad de detectores de emisión fluorescente.
2. El método de la reivindicación 1, que además comprende el ajuste de las ubicaciones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral de los eventos medidos para la muestra sin teñir basándose al menos en parte en una comparación entre los eventos medidos para la muestra sin teñir y los eventos medidos para la muestra teñida.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el ajuste comprende ajustar una escala del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral para los eventos de la muestra sin teñir con el fin de hacer corresponder de forma más estrecha las ubicaciones de los eventos de la muestra sin teñir con las ubicaciones de los eventos de la muestra teñida.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el valor de intensidad de fluorescencia asociado con cada región del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral para uno de la pluralidad de detectores de emisión fluorescente es una mediana o un promedio de la intensidad de fluorescencia medida asociada con eventos de la muestra sin teñir ubicados dentro de cada región respectiva para dicho detector de la pluralidad de detectores de emisión fluorescente.
5. El método de la reivindicación 4, en donde las regiones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral se definen como un conjunto de rangos no superpuestos de valores de intensidad de dispersión frontal y valores de intensidad de dispersión lateral.
6. El método de la reivindicación 5, en donde las regiones son cuadradas.
7. El método de la reivindicación 5, en donde las dimensiones de las regiones se seleccionan basándose al menos en parte en la densidad de eventos en diferentes ubicaciones en el diagrama de eventos de dispersión frontal-dispersión lateral.
8. El método de la reivindicación 1, en donde la medición de uno o más valores de intensidad de fluorescencia para uno o más eventos de una muestra sin teñir se realiza en una pluralidad de detectores de emisión fluorescente, en donde medir uno o más valores de intensidad de fluorescencia para uno o más eventos de una muestra teñida se realiza en la misma pluralidad de detectores de emisión fluorescente utilizados para medir uno o más valores de intensidad de fluorescencia para la muestra sin teñir.
9. El método de la reivindicación 8, que comprende, para cada uno del evento o eventos de la muestra teñida, la sustracción de una pluralidad de valores de intensidad de fluorescencia de las muestras sin teñir asociados con la región del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral que contiene la ubicación del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral del evento de la muestra teñida para la pluralidad de detectores de emisión fluorescente, de una pluralidad de valores de intensidad de fluorescencia medidos del evento de la muestra

- teñida en esa ubicación del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral medidos en la pluralidad de detectores de emisión fluorescente, en donde cada valor de intensidad de fluorescencia de la muestra sin teñir asociado con la región del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral que contiene esa ubicación del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral del evento de la muestra teñida, sustraído de un valor de intensidad de fluorescencia medido de la muestra teñida, está asociado con el mismo detector de emisión fluorescente que el valor de intensidad de fluorescencia medido de la muestra teñida.
- 5
10. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra sin teñir y la muestra teñida comprenden una pluralidad de tipos de células.
- 10
11. Un citómetro de flujo, el cual comprende:
- un láser de excitación (115 a-c);
- un sistema fluido configurado para transportar partículas de una o más muestras en una trayectoria del haz del láser de excitación;
- 15 uno o más detectores, en donde los detectores están configurados para:
- medir (910) uno o más valores de dispersión frontal, uno o más valores de dispersión lateral y uno o más valores de intensidad de fluorescencia para uno o más eventos de una muestra sin teñir; y
- 20 medir (930) uno o más valores de dispersión frontal, uno o más valores de dispersión lateral y uno o más valores de intensidad de fluorescencia para uno o más eventos de una muestra teñida; y
- un circuito de procesamiento, en el que el circuito de procesamiento está configurado para:
- 25 asociar (920) uno o más valores de intensidad de fluorescencia con una o más regiones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral basándose, al menos en parte, en mediciones de uno o más de dichos valores de dispersión frontal, uno o más valores de dispersión lateral y uno o más valores de intensidad de fluorescencia para el evento o eventos de la muestra sin teñir;
- 30 determinar (940) ubicaciones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral para la muestra teñida; y
- para cada uno de los eventos de la muestra teñida, sustraer (950) un valor de intensidad de fluorescencia de la muestra sin teñir asociado con la región del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral que contiene la ubicación del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral del evento de la muestra teñida de un valor de intensidad de fluorescencia medido del evento de la muestra teñida en esa ubicación del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral.
- 35
- 40 12. El citómetro de flujo de la reivindicación 11, en donde el circuito de procesamiento está configurado además para ajustar las ubicaciones del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral de los eventos medidos para la muestra sin teñir, basándose al menos en parte en una comparación entre los eventos medidos para la muestra sin teñir y los eventos medidos para la muestra teñida.
- 45 13. El citómetro de flujo de la reivindicación 12, en donde el procesador está configurado para ajustar una escala del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral para los eventos de la muestra sin teñir para hacer corresponder de forma más estrecha las ubicaciones de los eventos de la muestra sin teñir con las ubicaciones de los eventos de la muestra teñida.
- 50 14. El citómetro de flujo de la reivindicación 11, en donde el detector o detectores están configurados para realizar mediciones en uno o más canales de fluorescencia.
- 55 15. El citómetro de flujo de la reivindicación 12, en donde la muestra sin teñir y la muestra teñida comprenden una pluralidad de tipos de células.
16. El citómetro de flujo de la reivindicación 11, en donde el detector o detectores comprenden una pluralidad de detectores de emisión fluorescente, en donde cada detector está configurado para medir un valor de intensidad de fluorescencia para uno o más eventos de una muestra sin teñir, y en donde cada detector de emisión fluorescente está configurado además para medir un valor de intensidad de fluorescencia para uno o más eventos de una muestra teñida.
- 60
17. El citómetro de flujo de la reivindicación 16, en donde para cada uno del evento o eventos de la muestra teñida, el circuito de procesamiento está configurado para sustraer los valores de intensidad de fluorescencia de las muestras sin teñir asociados con la región del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral que contiene la ubicación del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral del evento de la muestra teñida para cada uno de la pluralidad de detectores de emisión fluorescente del valor de intensidad de fluorescencia medido del evento
- 65

- 5 de la muestra teñida en esa ubicación del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral para cada uno de la pluralidad de detectores de emisión fluorescente, en donde cada valor de intensidad de fluorescencia de la muestra sin teñir asociado con la región del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral que contiene esa ubicación del diagrama de dispersión frontal-dispersión lateral del evento de la muestra teñida sustraído de un valor de intensidad de fluorescencia medido de la muestra teñida está asociado con el mismo detector de emisión fluorescente que el valor de intensidad de fluorescencia medido de la muestra teñida.

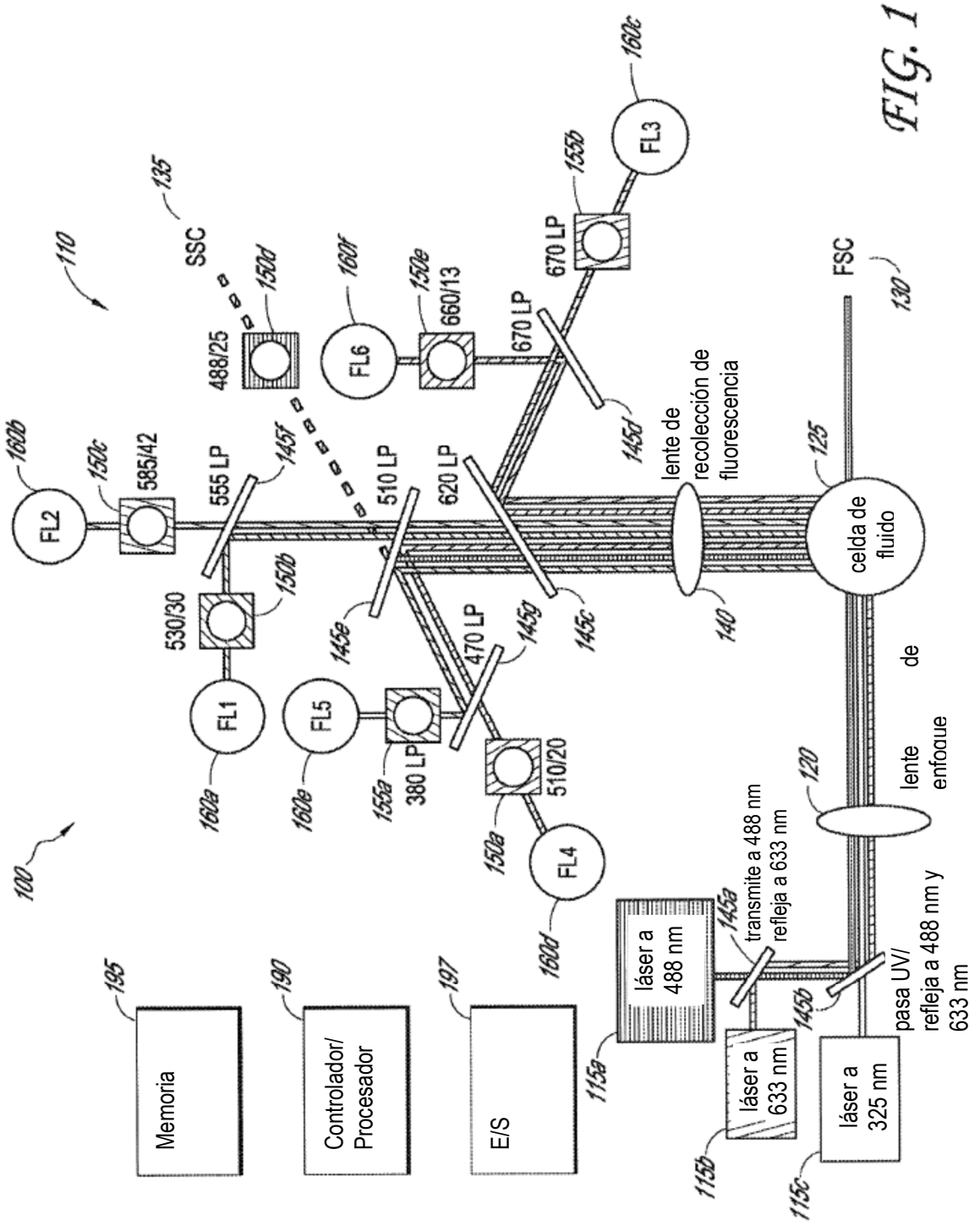


FIG. 1

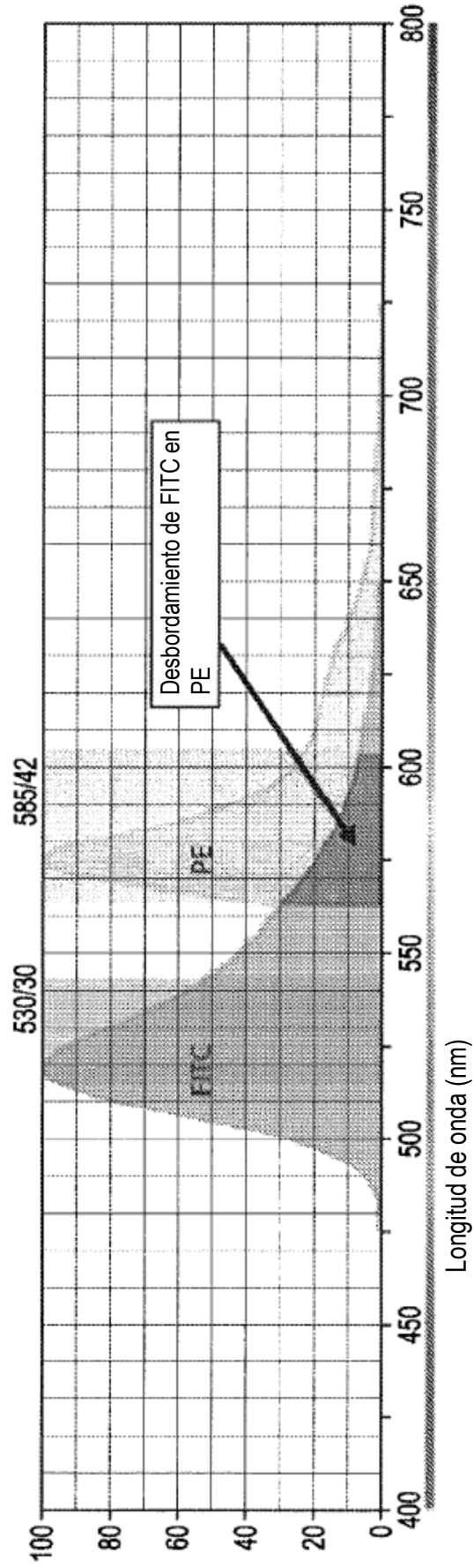


FIG. 2

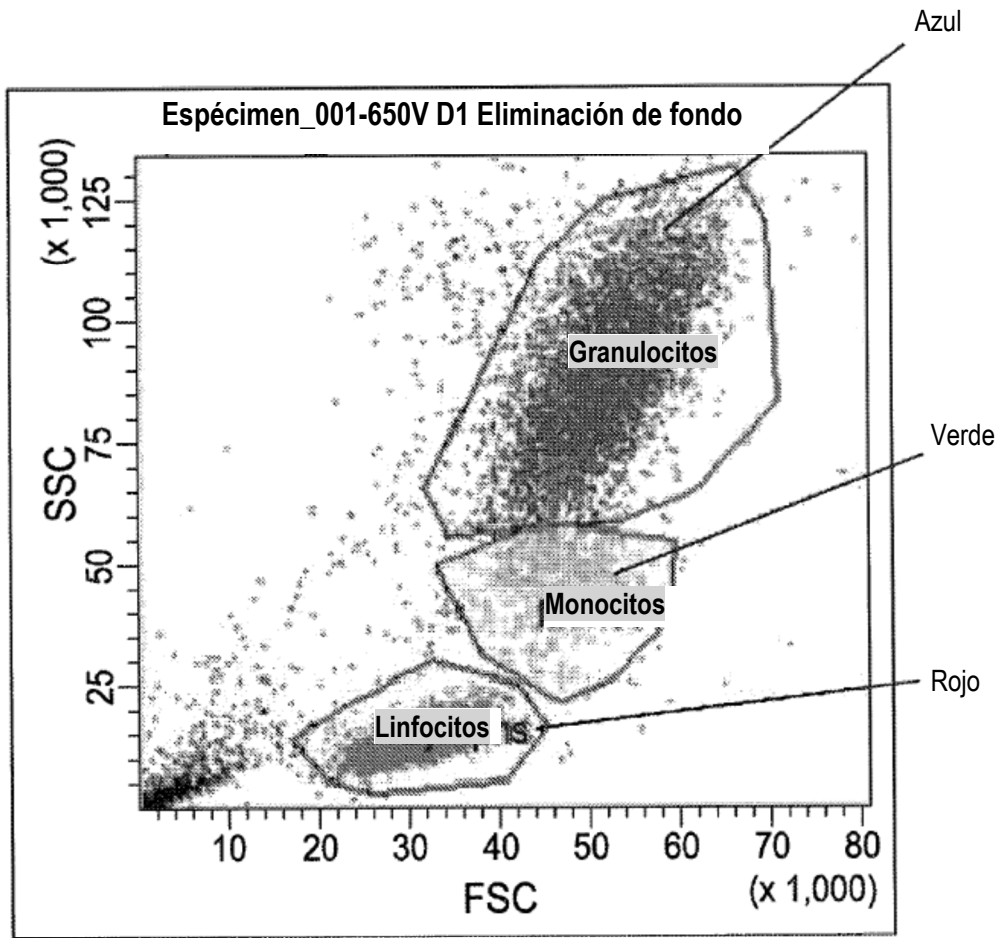


FIG. 3

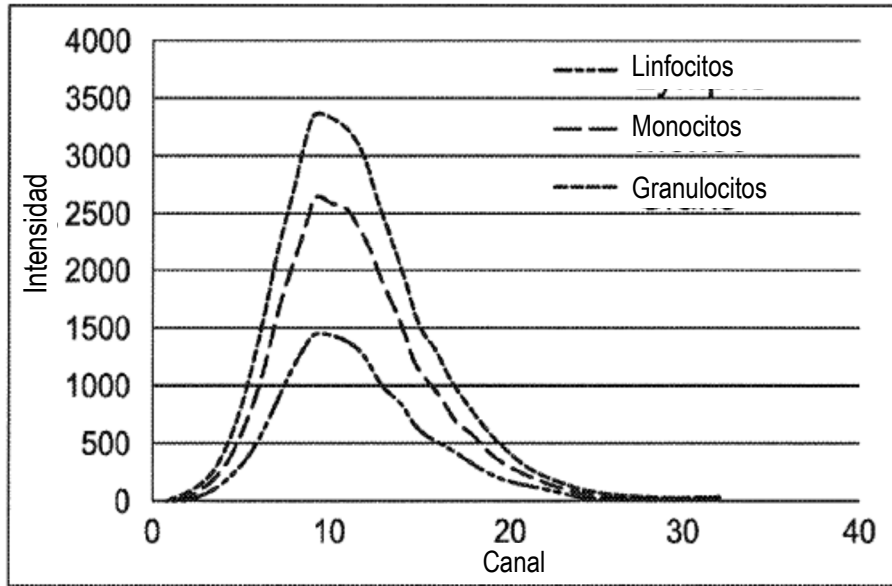


FIG. 4

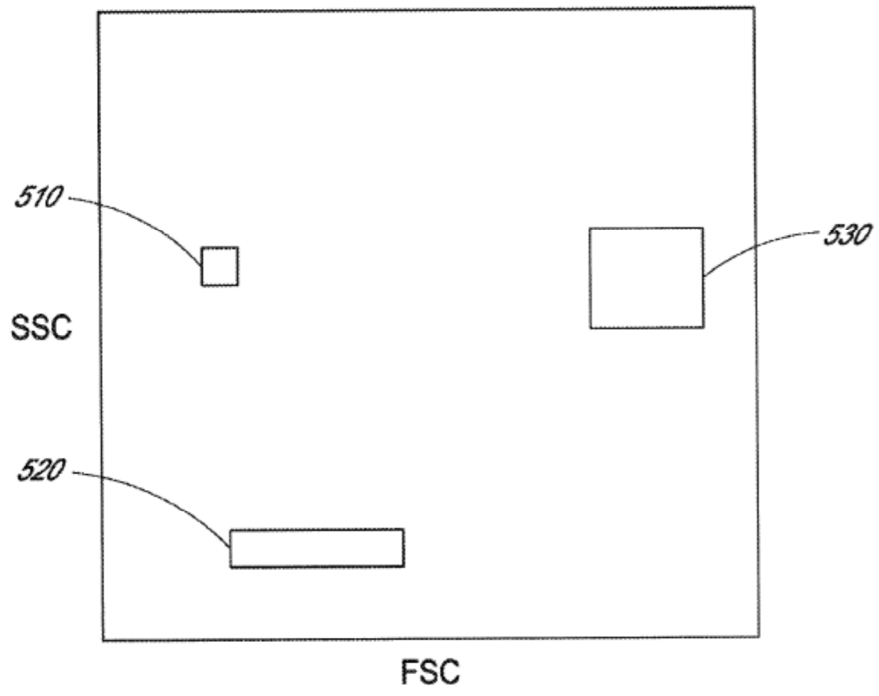
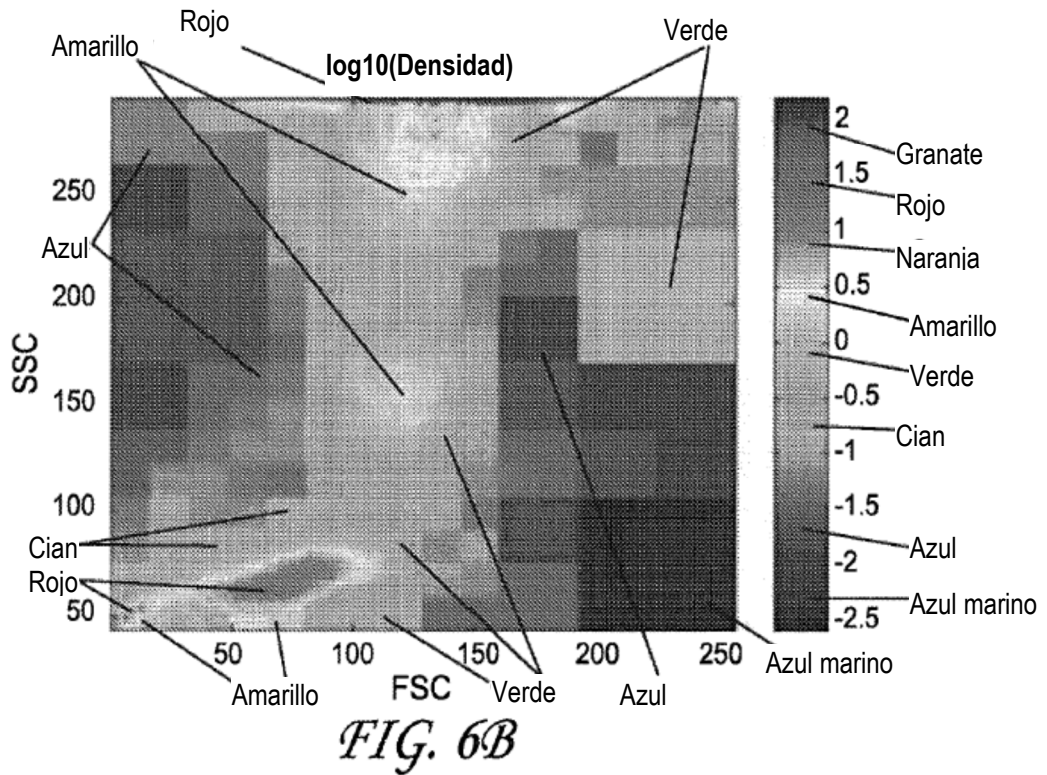
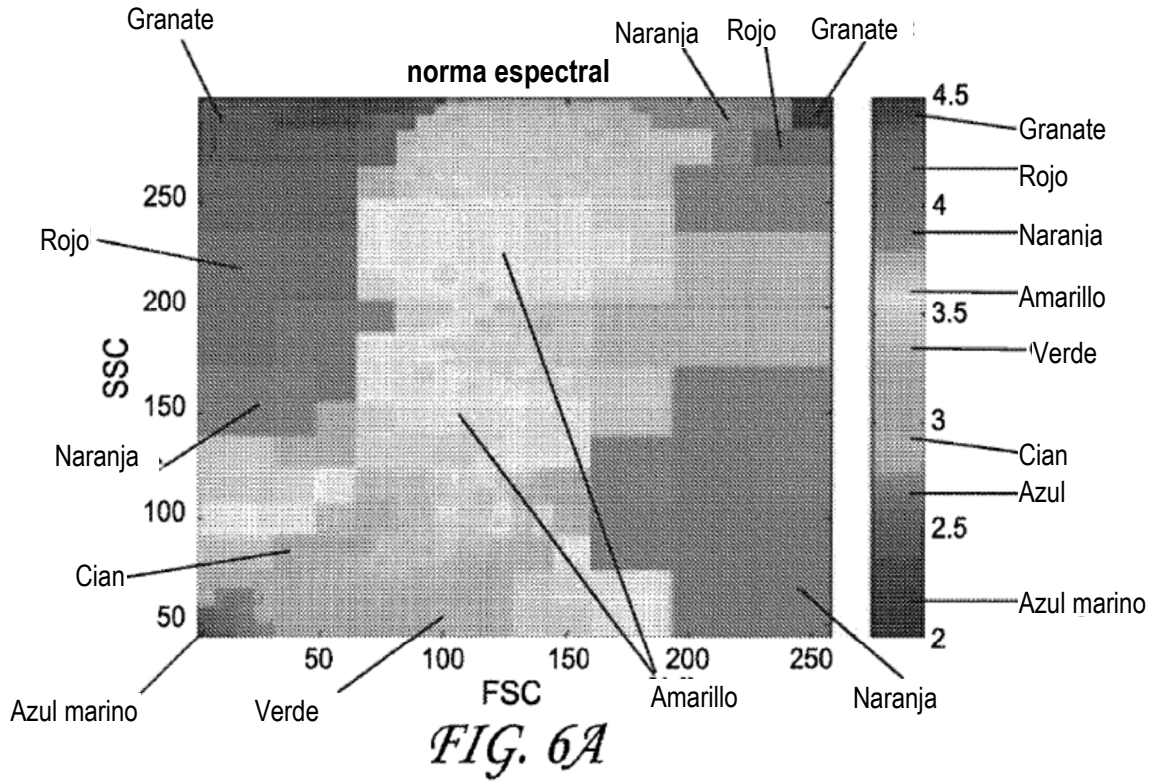


FIG. 5



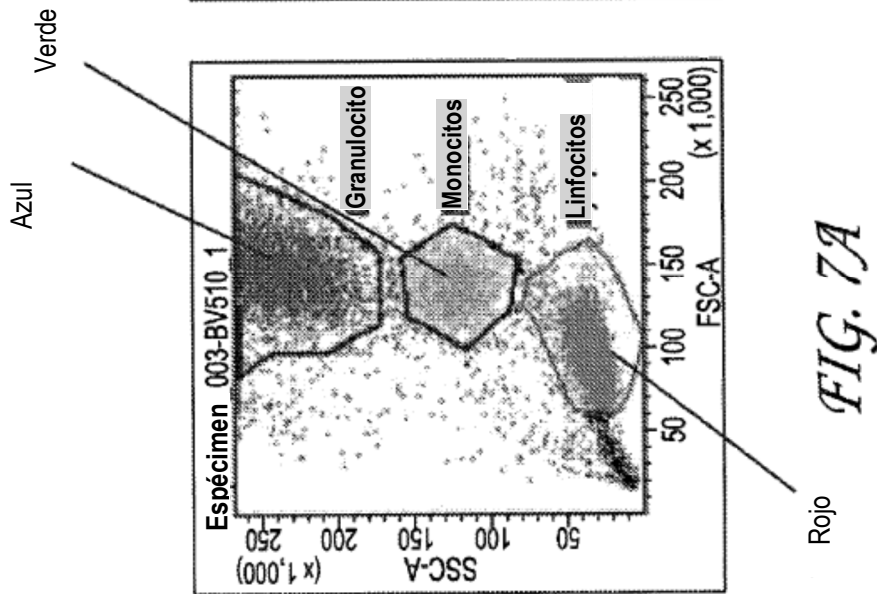


FIG. 7A

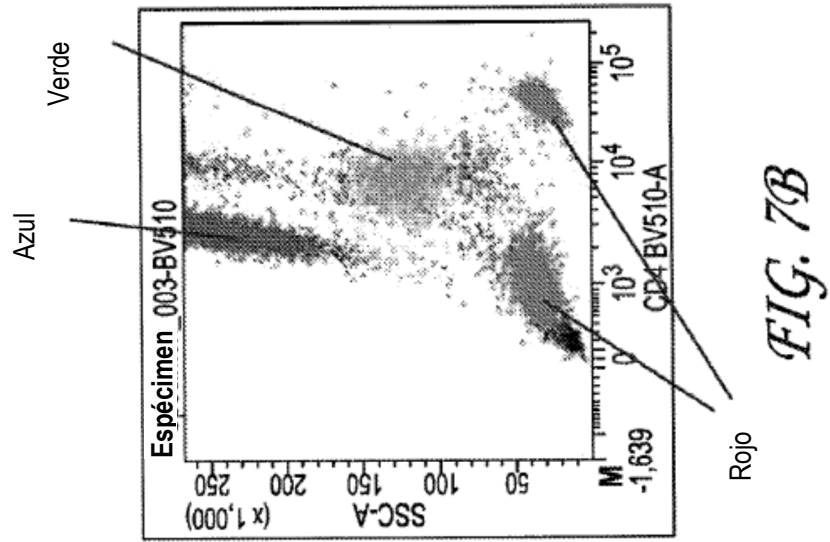


FIG. 7B

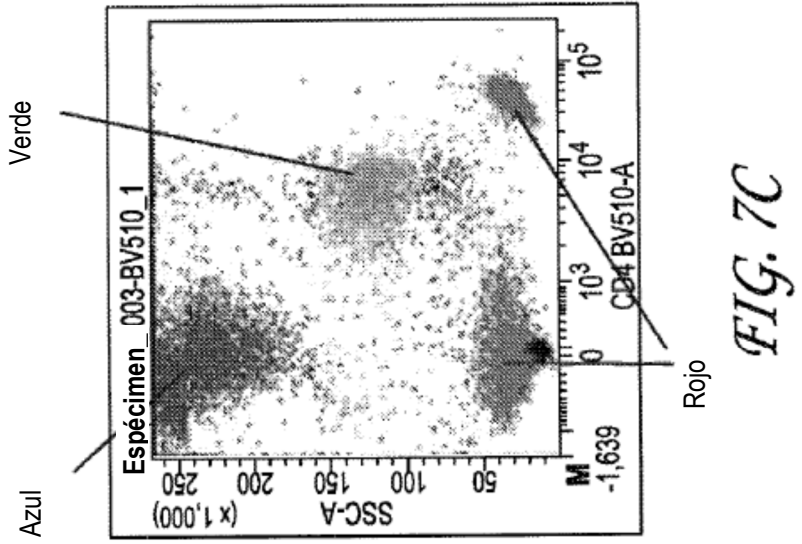


FIG. 7C

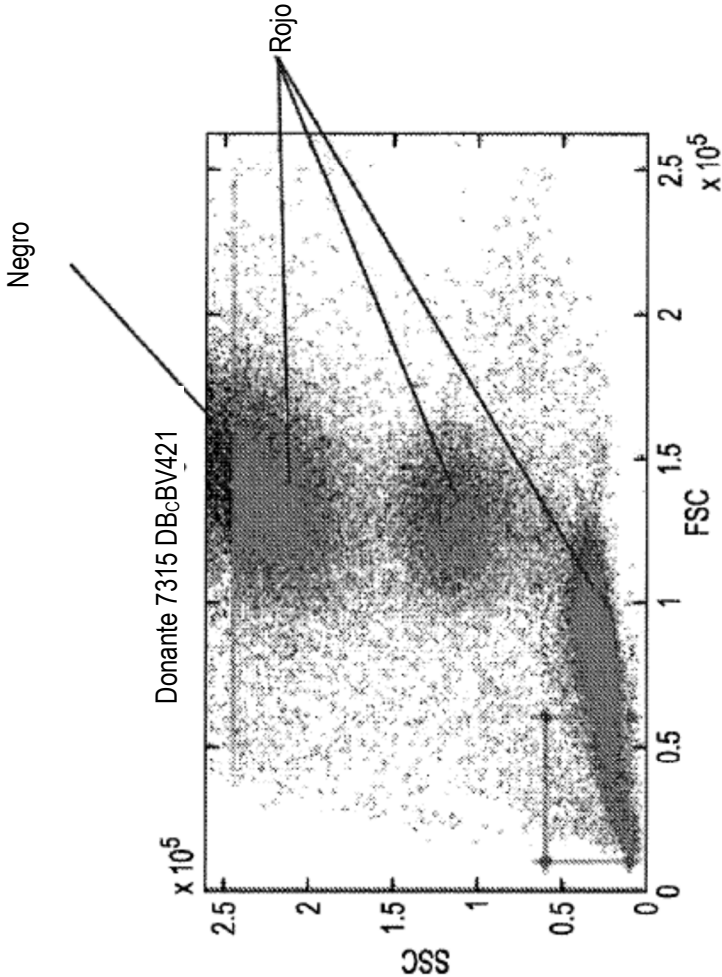


FIG. 8

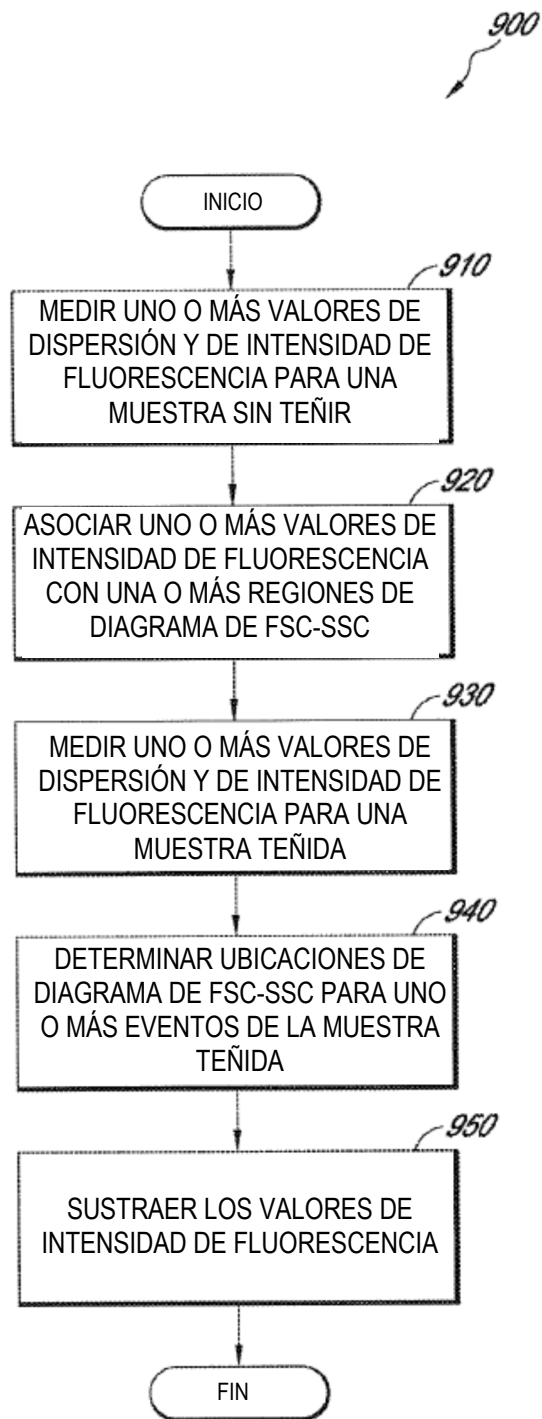


FIG. 9