

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 900 530**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2014 PCT/US2014/033835**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14169231**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2014 E 14782993 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.11.2021 EP 2984468**

54 Título: **Configuración automatizada para la clasificación celular**

30 Prioridad:

12.04.2013 US 201361811465 P

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

17.03.2022

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive, Mail Code 110
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**NORTON, PIERCE O. y
AZERSKY, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 900 530 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

Configuración automatizada para la clasificación celular

5 Los citómetros de flujo conocidos en la técnica se usan para analizar y clasificar partículas en una muestra de fluido, tales como células de una muestra de sangre o partículas de interés en cualquier otro tipo de muestra biológica o química. Un citómetro de flujo incluye típicamente un depósito de muestra para recibir una muestra de fluido, tal como una muestra de sangre, y un depósito de la vaina que contiene un fluido de la vaina. El citómetro de flujo transporta las partículas (en lo sucesivo denominadas "células") en la muestra de fluido como una corriente de células a una célula de flujo, mientras que también dirige el fluido de la vaina a la célula de flujo.

15 Dentro de la célula de flujo, se forma una vaina de líquido alrededor de la corriente de células para impartir una velocidad sustancialmente uniforme en la corriente de células. La célula de flujo enfoca hidrodinámicamente las células dentro de la corriente para pasar a través del centro de un rayo láser en una célula de flujo. El punto en el cual las células se cruzan con el rayo láser se conoce comúnmente como el punto de interrogación. A medida que una célula se mueve a través del punto de interrogación, provoca que la luz láser se disperse. La luz láser también excita componentes en la corriente de células que tienen propiedades fluorescentes, tales como marcadores fluorescentes que se han agregado a la muestra de fluido y adherido a ciertas células de interés, o perlas fluorescentes mezcladas en la corriente. El citómetro de flujo incluye un sistema de detección adecuado que consta de tubos fotomultiplicadores, fotodiodos u otros dispositivos de detección de luz, que se enfocan en el punto de intersección. El citómetro de flujo analiza la luz detectada para medir las propiedades físicas y fluorescentes de la célula. El citómetro de flujo puede clasificar además las células en base a estas propiedades medidas. La corriente de flujo sale de la célula de flujo a través de una boquilla con un diámetro de la boquilla que es adecuado para el sistema fluídico y la tasa de clasificación deseada.

30 Para clasificar las células por un método electrostático, la célula deseada debe contenerse dentro de una gotita cargada eléctricamente. Para producir gotitas, la célula de flujo se hace vibrar rápidamente mediante un dispositivo acústico, tal como un elemento piezoeléctrico. El volumen de una gotita se estima convencionalmente por las propiedades hidrodinámicas de la corriente de flujo y las dimensiones de la boquilla. Para cargar la gotita, la célula de flujo incluye un elemento de carga cuyo potencial eléctrico puede cambiarse rápidamente. Debido a que la corriente de células sale de la célula de flujo en una dirección vertical sustancialmente hacia abajo, las gotitas también se propagan en esa dirección después de que se forman. Las gotitas, si se cargan o se descargan deben recogerse en un recipiente de recogida de la muestra que se dirige adecuadamente para recoger una o más corrientes de flujo generadas por las placas de desviación. En consecuencia, las gotitas y las células contenidas en las mismas pueden recogerse en recipientes de recogida adecuados aguas abajo de las placas.

40 Los citómetros de flujo conocidos similares al tipo descrito anteriormente se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Núms. 3,960,449, 4,347,935, 4,667,830, 5,464,581, 5,483,469, 5,602,039, 5,643,796 y 5,700,692. Otros tipos de citómetros de flujo conocidos son los sistemas FACSVantage™, FACSort™, FACSCount™, FACScan™, y FACSCalibur™, cada uno fabricado por Becton Dickinson and Company, el cesionario de la presente invención.

45 Aunque este método generalmente permite que el citómetro de flujo dispense células clasificadas en recipientes de recogida y por lo tanto clasificar las células de interés con una precisión razonable, el método requiere una cantidad sustancial de información del usuario en el momento de la configuración. La corriente de flujo y los recipientes de recogida se alinean convencionalmente de manera manual. Los parámetros fluídicos tales como la velocidad de flujo y la composición del fluido de la vaina deben hacerse coincidir con un diámetro de la boquilla adecuado.

50 Pueden encontrarse ejemplos adicionales de la técnica anterior relevante en los documentos US6589792, US2011/267604, US2009/061513, y US2011/033339 que describen sistemas de citómetros de flujo que usan imágenes de la corriente de flujo y posicionamiento de los miembros del citómetro de flujo.

Resumen

60 Los aspectos de la presente descripción incluyen sistemas para ajustar uno o más parámetros de un citómetro de flujo. Los sistemas de acuerdo con ciertas modalidades incluyen un sensor de formación de imágenes configurado para capturar una o más imágenes de un campo de detección de una corriente de flujo del citómetro de flujo y un procesador configurado para generar una señal de datos a partir de la una o más imágenes capturadas de manera que el sistema ajusta uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos.

65

En ciertas modalidades, los sistemas objeto se configuran para reducir la necesidad de entrada del usuario o ajuste manual durante el análisis de la muestra con un citómetro de flujo. En algunas modalidades, los sistemas de interés pueden automatizarse parcialmente o totalmente de manera que los ajustes de los parámetros de un citómetro de flujo se controlen por el procesador. En ciertas modalidades, los sistemas objeto se configuran para ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo sin ninguna intervención humana.

La presente descripción proporciona un sistema para localizar automáticamente la posición de una corriente en un flujo de líquido de un citómetro de flujo que comprende una primera cámara, adaptada para detectar la posición de la corriente en un primer campo de detección y para generar una primera señal representativa de la posición de la corriente y una primera etapa en donde la primera etapa se conecta operativamente a la primera cámara y se configura para moverse en un plano XY en respuesta a la primera señal.

El sistema incluye una segunda cámara adaptada para detectar una posición de la corriente en un segundo campo de detección y para generar una segunda señal representativa de la posición de la corriente en donde el primer y segundo campos de detección de la primera y segunda cámaras se orientan sustancialmente de manera ortogonal en el plano XY en donde la primera etapa se conecta operativamente a la segunda cámara y se configura para mover el plano XY en respuesta a la segunda señal en adición de la primera señal. Se monta un láser o se monta un dispositivo de recogida en la primera etapa.

El sistema incluye una segunda etapa en donde un dispositivo de recogida se monta en la segunda etapa y la segunda etapa se configura para moverse en el plano XY en respuesta a la primera señal y la segunda señal. El sistema también puede comprender un sistema eléctrico configurado para ajustar una carga eléctrica en la corriente de flujo en respuesta a la segunda señal de la segunda cámara. La conexión operativa entre las cámaras y las etapas se media por un procesador conectado a la primera cámara y la primera y segunda cámaras y la primera etapa y en donde el procesador se configura para recibir las señales de la primera y segunda cámaras y calcular una posición óptima para la primera etapa. En algunas modalidades la conexión operativa se media por un procesador conectado a la primera y segunda cámaras y la segunda etapa y se configura para recibir las señales de la primera y segunda cámaras y calcular una posición óptima para la segunda etapa. En algunas modalidades la corriente puede incluir una serie de gotas.

Se proporciona un sistema de acuerdo con ciertas modalidades para determinar automáticamente un diámetro de abertura de la boquilla con una primera cámara, adaptada para detectar una dimensión de la corriente en un primer campo de detección y para generar una primera señal representativa de la dimensión de la corriente y un procesador que tiene una memoria con instrucciones en el mismo configurado para determinar un valor para el diámetro de abertura de la boquilla a partir de la dimensión de la corriente y transmitir el valor a un citómetro de flujo. La dimensión de la corriente puede ser el ancho de la corriente. En algunas modalidades el citómetro de flujo puede configurarse para ajustar automáticamente una serie de parámetros después de recibir el valor transmitido. La serie de parámetros puede seleccionarse del grupo que comprende presión hidrostática, carga de las gotas, tensión de desviación, valor de corrección de carga, retardo de las gotas, frecuencia de las gotas, amplitud de las gotas, y fase de carga.

Los aspectos de la descripción también incluyen métodos para ajustar uno o más parámetros de un citómetro de flujo. Los métodos de acuerdo con la invención incluyen capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección, determinar una o más propiedades de la corriente de flujo en el campo de detección, generar una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo y ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos.

Los aspectos de la presente descripción también incluyen sistemas controlados por ordenador para poner en práctica los métodos objeto, donde los sistemas incluyen además uno o más ordenadores que tienen procesadores configurados para automatizar una o más etapas de los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, los sistemas incluyen un ordenador que tiene un medio de almacenamiento legible por ordenador con un programa informático almacenado en el mismo, donde el programa informático cuando se carga en el ordenador incluye instrucciones para capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección; el algoritmo para determinar la posición espacial de la corriente de flujo en el campo de detección; el algoritmo para generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo; e instrucciones para ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos. En ciertos casos, los sistemas incluyen un ordenador que tiene un medio de almacenamiento legible por ordenador con un programa informático almacenado en el mismo, donde el programa informático cuando se carga en el ordenador incluye instrucciones para capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección; el algoritmo para determinar las dimensiones físicas de la corriente de flujo en el campo de detección; el algoritmo para generar una señal de datos correspondiente a las dimensiones físicas de la corriente de flujo; e instrucciones para ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos.

Breve descripción de las figuras

La invención puede entenderse mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con los dibujos acompañantes. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras:

- La Figura 1 representa una ilustración esquemática de un sistema de acuerdo con ciertas modalidades.
- La Figura 2 representa un diagrama de flujo que ilustra las etapas para poner en práctica los métodos de la presente descripción de acuerdo con ciertas modalidades.
- La Figura 3 representa un diagrama de flujo que ilustra las etapas para poner en práctica los métodos de la presente descripción de acuerdo con ciertas modalidades.

Descripción detallada

Antes de que la presente invención se describa con mayor detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a las modalidades particulares descritas, como tales pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción tiene el propósito de describir sólo modalidades particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se limitará sólo mediante las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese intervalo declarado, se incluye dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también se incluyen dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo declarado. Cuando el intervalo declarado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado como comúnmente se entiende por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción también pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos representativos.

La cita de cualquier publicación es para su descripción antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a ser anterior a tal publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas de manera independiente.

Se observa que, como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de tal terminología exclusiva como "únicamente", "sólo" y similares en relación con la exposición de elementos de las reivindicaciones, o el uso de una limitación "negativa".

Como será evidente para los expertos en la técnica al leer esta descripción, cada una de las modalidades individuales descritas e ilustradas en la presente descripción tiene componentes y características discretas que pueden separarse fácilmente de o combinarse con las características de cualquiera de las otras diversas modalidades sin apartarse del alcance de la presente invención. Cualquier método expuesto puede llevarse a cabo en el orden de los eventos expuestos o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

Como se resumió anteriormente, la presente descripción proporciona sistemas configurados para automatizar los ajustes de uno o más parámetros de un citómetro de flujo. En las modalidades de la descripción que se describen adicionalmente, los sistemas configurados para ajustar uno o más parámetros de un citómetro de flujo primero se describen con mayor detalle. A continuación, se describen métodos para ajustar uno o más parámetros de un citómetro de flujo con los sistemas objeto. También se proporcionan sistemas controlados por ordenador que automatizan los ajustes a uno o más parámetros de un citómetro de flujo.

Sistemas para ajustar los parámetros de un citómetro de flujo

Los aspectos de la presente descripción incluyen sistemas configurados para ajustar los parámetros de un citómetro de flujo. El término "ajustar" se usa en la presente descripción en su sentido convencional para referirse a cambiar uno o más parámetros funcionales del citómetro de flujo. Como se describe con mayor detalle más abajo, el ajuste deseado puede variar en términos del objetivo, donde en algunos casos los

ajustes deseados son ajustes que finalmente dan como resultado una mayor eficiencia de algún parámetro deseable, por ejemplo, precisión de clasificación de células mejorada, recogida de partículas mejorada, identificación de mal funcionamiento de componentes (por ejemplo, boquilla de la célula de flujo obstruida), consumo de energía, eficiencia de carga de partículas, carga de partículas más precisa, desviación de partículas mejorada durante la clasificación de células, entre otros ajustes. En las modalidades, los sistemas objeto se configuran para reducir la necesidad de entrada del usuario o ajuste manual durante el análisis de la muestra con un citómetro de flujo. En ciertas modalidades, los sistemas de interés pueden automatizarse completamente de manera que los ajustes de los parámetros de un citómetro de flujo se controlen por el procesador. Por "totalmente automatizado" se entiende que los ajustes hechos en respuesta a las señales de datos correspondientes a uno o más parámetros de la corriente de flujo y derivados de una o más imágenes capturadas de la corriente de flujo requieren poca o ninguna intervención humana o entrada manual en los sistemas objeto. En ciertas modalidades, los sistemas objeto se configuran para ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en base a las señales de datos correspondientes a uno o más parámetros de la corriente de flujo sin ninguna intervención humana.

Como se resumió anteriormente, los sistemas incluyen uno o más sensores de formación de imágenes configurados para capturar imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en uno o más campos de detección. Por "campo de detección" se entiende la región de la corriente de flujo de la cual se forman imágenes mediante el uno o más sensores de formación de imágenes. Los campos de detección pueden variar en dependencia de las propiedades de la corriente de flujo que se interroga. En las modalidades, el campo de detección puede abarcar 0,001 mm o más de la corriente de flujo, tal como 0,005 mm o más, tal como 0,01 mm o más, tal como 0,05 mm o más, tal como 0,1 mm o más, tal como 0,5 mm o más, tal como 1 mm o más, tal como 2 mm o más, tal como 5 mm o más e incluye 10 mm o más de la corriente de flujo. Por ejemplo, cuando los sistemas objeto se configuran para determinar una dimensión física (por ejemplo, ancho) de la corriente de flujo, el campo de detección puede ser una sección transversal plana de la corriente de flujo. En otro ejemplo, cuando los sistemas objeto se configuran para determinar la posición espacial de la corriente de flujo, el campo de detección puede ser una longitud predeterminada de la corriente de flujo, tal como por ejemplo para determinar el ángulo formado por la corriente de flujo con respecto a la eje de la boquilla de la célula de flujo.

El campo de detección interrogado por los sistemas objeto puede variar en dependencia del parámetro del citómetro de flujo que se ajusta. En algunas modalidades, el campo de detección incluye el orificio de la boquilla de la célula de flujo. En otras modalidades, el campo de detección incluye la ubicación de la corriente de flujo donde se cargan las gotas que contienen las partículas de interés (es decir, el punto de "ruptura" donde la corriente de flujo continuo comienza a formar gotitas discretas). En otras modalidades, el campo de detección incluye la región donde las partículas cargadas se desvían por placas deflectoras durante la clasificación de células.

Los sistemas incluyen uno o más sensores de formación de imágenes configurados para capturar imágenes de una corriente de flujo en un campo de detección. El sensor de formación de imágenes puede ser cualquier dispositivo adecuado capaz de capturar y convertir una imagen óptica en una señal de datos electrónica, que incluyen pero no se limitan a dispositivos con carga acoplada, dispositivos semiconductores con carga acoplada (CCD), sensores de píxeles activos (APS), sensores de formación de imágenes de semiconductores de óxido de metal complementarios (CMOS) o sensores de formación de imágenes de semiconductores de óxido de metal de tipo N (NMOS). En algunas modalidades, el sensor de formación de imágenes es una cámara CCD. Por ejemplo, la cámara puede ser una cámara CCD multiplicadora de electrones (EMCCD) o una cámara CCD intensificada (ICCD). En otras modalidades, el sensor de formación de imágenes es una cámara de tipo CMOS.

En dependencia del número de campos de detección que se interrogan y de los parámetros de interés del citómetro de flujo, el número de sensores de formación de imágenes en los sistemas objeto puede variar, como se desee. Por ejemplo, los sistemas objeto pueden incluir un sensor de formación de imágenes o más, tales como dos sensores de formación de imágenes o más, tales como tres sensores de formación de imágenes o más, tales como cuatro sensores de formación de imágenes o más, tales como cinco sensores de formación de imágenes o más e incluyen diez sensores de formación de imágenes o más. En ciertas modalidades, los sistemas incluyen un sensor de formación de imágenes. En otras modalidades, los sistemas incluyen dos sensores de formación de imágenes. Cuando los sistemas incluyen más de un sensor de formación de imágenes, cada sensor de formación de imágenes puede orientarse con respecto al otro (como se hace referencia en un plano X-Y) en un ángulo que varía de 10° a 90°, tal como de 15° a 85°, tal como de 20° a 80°, tal como de 25° a 75° e incluyen de 30° a 60°. Cada sensor de formación de imágenes se orienta ortogonalmente (como se hace referencia en un plano X-Y) entre sí. Por ejemplo, cuando los sistemas objeto incluyen dos sensores de formación de imágenes, el primer sensor de formación de imágenes se orienta ortogonalmente (como se hace referencia en un plano X-Y) al segundo sensor de formación de imágenes.

Cuando los sistemas objeto incluyen más de un sensor de formación de imágenes, cada sensor de formación de imágenes puede ser el mismo o una combinación de sensores. Por ejemplo, cuando los sistemas objeto

incluyen dos sensores de formación de imágenes, en algunas modalidades el primer sensor de formación de imágenes es un dispositivo de tipo CCD y el segundo sensor de formación de imágenes es un dispositivo de tipo CMOS. En otras modalidades, tanto el primer como el segundo sensores de formación de imágenes son dispositivos de tipo CCD. En otras modalidades, tanto el primer como el segundo sensores de formación de imágenes son dispositivos de tipo CMOS.

En algunas modalidades, los sensores de formación de imágenes son estacionarios, que mantienen una sola posición dentro del citómetro de flujo. En otras modalidades, los sensores de formación de imágenes pueden configurarse para moverse a lo largo de la trayectoria de la corriente de flujo. Por ejemplo, el sensor de formación de imágenes puede configurarse para moverse aguas arriba y aguas abajo a lo largo de la corriente de flujo al capturar imágenes en una pluralidad de campos de detección. Por ejemplo, los sistemas pueden incluir un sensor de formación de imágenes que se adapta para capturar imágenes en dos o más campos de detección diferentes a lo largo de la corriente de flujo, tal como 3 o más campos de detección, tal como 4 o más campos de detección e incluyen 5 o más campos de detección. Cuando el sensor de formación de imágenes puede moverse a lo largo de la trayectoria de la corriente de flujo continuamente o en intervalos discretos. En algunas modalidades, el sensor de formación de imágenes se desplaza continuamente. En otras modalidades, el sensor de formación de imágenes puede desplazarse a lo largo de la trayectoria de la corriente de flujo en intervalos discretos, tal como por ejemplo en incrementos de 1 mm o más, tal como incrementos de 2 mm o más e incluye incrementos de 5 mm o más.

Cuando el sensor de formación de imágenes se configura para capturar imágenes en diferentes posiciones a lo largo de una trayectoria de la corriente de flujo, el sensor de formación de imágenes puede configurarse para capturar imágenes continuamente o en intervalos discretos. En algunos casos, los sensores de formación de imágenes de interés se configuran para capturar imágenes continuamente. En otros casos, los sensores de formación de imágenes se configuran para tomar mediciones en intervalos discretos, tales como capturar una imagen de la corriente de flujo cada 0,001 milisegundos, cada 0,01 milisegundos, cada 0,1 milisegundos, cada 1 milisegundo, cada 10 milisegundos, cada 100 milisegundos e incluyen cada 1000 milisegundos, o algún otro intervalo.

Como se describe con mayor detalle más abajo, el sensor de formación de imágenes se configura para capturar una o más imágenes de la corriente de flujo en cada campo de detección. Por ejemplo, el sensor de formación de imágenes puede configurarse para capturar 2 o más imágenes de la corriente de flujo en cada campo de detección, tal como 3 o más imágenes, tal como 4 o más imágenes, tal como 5 o más imágenes, tal como 10 o más imágenes, tal como 15 o más imágenes e incluye 25 o más imágenes. Cuando se captura una pluralidad de imágenes en un campo de detección, el procesador (como se discute más abajo) puede incluir un algoritmo de procesamiento de formación de imágenes digitales para unir la pluralidad de imágenes.

En dependencia de la tasa de la corriente de flujo y la resolución de imagen deseada, el sensor de formación de imágenes puede tener un tiempo de exposición de 100 ms o menos cuando se lee el sensor completo, tal como 75 ms o menos, tal como 50 ms o menos, tal como 25 ms o menos, tal como 10 ms o menos, tal como 5 ms o menos, tal como 1 ms o menos, tal como 0,1 ms o menos, tal como 0,01 ms o menos, tal como 0,001 ms o menos, tal como 0,0001 ms o menos, tal como 0,00001 ms o menos e incluye un tiempo de exposición de 0,000001 ms o menos. Por ejemplo, el tiempo de exposición del sensor de formación de imágenes en un campo de detección que captura imágenes de la corriente de flujo en el orificio de la boquilla de la célula de flujo puede tener un tiempo de exposición que varía de 0,0001 ms a 10 ms, tal como de 0,001 ms a 5 ms, tal como de 0,01 ms a 2 ms e incluye de 0,1 ms a 1 ms. El tiempo de exposición de los sensores de formación de imágenes en un campo de detección que captura imágenes de la corriente de flujo del citómetro de flujo aguas abajo desde el orificio de la boquilla puede tener un tiempo de exposición que varía de 0,0001 ms a 10 ms, tal como de 0,001 ms a 5 ms, tal como de 0,01 ms a 2 ms e incluye de 0,1 ms a 1 ms.

En ciertas modalidades, los sensores de formación de imágenes en los sistemas objeto pueden tener 1 M de píxeles activos o más, tal como 1,5 M o más, por ejemplo, 2 M o más, 2,5 M o más, o 3 M o más. En ciertos aspectos, un píxel corresponde a una dimensión física real de aproximadamente 0,3 μm . En dependencia del campo de detección, en algunos casos, los sensores de formación de imágenes tienen un área de sensor de 150 mm^2 o más, tal como aproximadamente 150 mm^2 a aproximadamente 175 mm^2 , aproximadamente 175 mm^2 a aproximadamente 200 mm^2 , aproximadamente 200 mm^2 a aproximadamente 225 mm^2 , aproximadamente 225 mm^2 a aproximadamente 250 mm^2 , aproximadamente 250 mm^2 a aproximadamente 300 mm^2 , aproximadamente 300 mm^2 a aproximadamente 400 mm^2 , aproximadamente 400 mm^2 a aproximadamente 500 mm^2 , aproximadamente 500 mm^2 a aproximadamente 750 mm^2 , aproximadamente 750 mm^2 a aproximadamente 1000 mm^2 , o aproximadamente 1000 mm^2 o más.

El sensor de formación de imágenes puede colocarse a cualquier distancia adecuada de la corriente de flujo del citómetro de flujo siempre que el campo de detección sea capaz de capturar una imagen de la corriente de flujo. Por ejemplo, el sensor de formación de imágenes puede colocarse a 0,01 mm o más de la corriente de flujo, tal como 0,05 mm o más, tal como 0,1 mm o más, tal como 0,5 mm o más, tal como 1 mm o más, tal

como 2,5 mm o más, tal como 5 mm o más, tal como 10 mm o más, tal como 15 mm o más, tal como 25 mm o más e incluye 50 mm o más de la corriente de flujo del citómetro de flujo.

5 En algunas modalidades, el sensor de formación de imágenes se coloca en un ángulo con respecto al eje de la corriente de flujo. Por ejemplo, el sensor de formación de imágenes puede colocarse en un ángulo con respecto al eje de la corriente de flujo que varía de 10° a 90°, tal como de 15° a 85°, tal como de 20° a 80°, tal como de 25° a 75° e incluye de 30° a 60°. En ciertas modalidades, el sensor de formación de imágenes se coloca en un ángulo de 90° con respecto al eje de la corriente de flujo.

10 En algunos casos, el sensor de formación de imágenes también incluye un protocolo de ajuste óptico. Por "ajuste óptico" se entiende que capturar imágenes del campo de detección mediante el sensor de formación de imágenes puede cambiarse como se desee, tal como para aumentar o disminuir las dimensiones capturadas o para mejorar la resolución óptica de la imagen. En algunos casos, el ajuste óptico es un protocolo de aumento configurado para aumentar el tamaño del campo de detección capturado por el sensor de formación de imágenes, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más e incluye aumentar el campo de detección del sensor de formación de imágenes en 75 % o más. En otros casos, el ajuste óptico es un protocolo de reducción configurado para disminuir el tamaño del campo de detección capturado por el sensor de formación de imágenes, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más e incluye disminuir el ancho de la viga en forma de hendidura en 75 % o más. En ciertas modalidades, el ajuste óptico es un protocolo de resolución mejorada configurado para mejorar la resolución de las imágenes capturadas, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más e incluye mejorar la resolución de las imágenes capturadas en 75 % o más. Capturar imágenes del campo de detección mediante el sensor de formación de imágenes puede ajustarse con cualquier protocolo de ajuste óptico conveniente, que incluye pero no se limita a lentes, espejos, filtros y combinaciones de los mismos. En ciertas modalidades, el sensor de formación de imágenes incluye una lente de enfoque. La lente de enfoque, por ejemplo puede ser una lente de reducción. En otras modalidades, la lente de enfoque es una lente de aumento.

30 Los sensores de formación de imágenes de la presente descripción también pueden incluir uno o más separadores de longitud de onda. El término "separador de longitud de onda" se usa en la presente descripción en su sentido convencional para referirse a un protocolo óptico para separar la luz policromática en sus longitudes de onda componentes para la detección. La separación de longitudes de onda, de acuerdo con ciertas modalidades, puede incluir pasar o bloquear selectivamente longitudes de onda específicas o intervalos de longitudes de onda de la luz policromática. Para separar longitudes de onda de luz, la luz transmitida puede pasarse a través de cualquier protocolo de separación de longitud de onda conveniente, que incluye pero no se limita a vidrio coloreado, filtros de paso de banda, filtros de interferencia, espejos dicróicos, rejillas de difracción, monocromadores y combinaciones de los mismos, entre otros protocolos de separación de longitudes de onda. En dependencia del campo de detección, la fuente de luz y la corriente de flujo que se visualizan, los sistemas pueden incluir uno o más separadores de longitud de onda, tal como dos o más, tal como tres o más, tal como cuatro o más, tal como cinco o más e incluyen 10 o más separadores de longitud de onda. En un ejemplo, los sensores de formación de imágenes incluyen un filtro de paso de banda. En otro ejemplo, los sensores de formación de imágenes incluyen dos o más filtros de paso de banda. En otro ejemplo, los sensores de formación de imágenes incluyen dos o más filtros de paso de banda y una rejilla de difracción. En otro ejemplo, los sensores de formación de imágenes incluyen una pluralidad de filtros de paso de banda y un monocromador. En ciertas modalidades, los sensores de formación de imágenes incluyen una pluralidad de filtros de paso de banda y rejillas de difracción configurados en una configuración de rueda de filtros. Cuando los sensores de formación de imágenes incluyen dos o más separadores de longitud de onda, los separadores de longitud de onda pueden utilizarse individualmente o en serie para separar la luz policromática en longitudes de onda de componentes. En algunas modalidades, los separadores de longitud de onda se disponen en serie. En otras modalidades, los separadores de longitud de onda se disponen individualmente de manera que se realicen una o más mediciones mediante el uso de cada uno de los separadores de longitud de onda.

55 En algunas modalidades, los sistemas incluyen uno o más filtros ópticos, tal como uno o más filtros de paso de banda. Por ejemplo, en algunos casos los filtros ópticos de interés son filtros de paso de banda que tienen anchos de banda mínimos que varían de 2 nm a 100 nm, tal como de 3 nm a 95 nm, tal como de 5 nm a 95 nm, tal como de 10 nm a 90 nm, tal como de 12 nm a 85 nm, tal como de 15 nm a 80 nm e incluyen filtros de paso de banda que tienen anchos de banda mínimos que varían de 20 nm a 50 nm. En otros casos, los filtros ópticos son filtros de paso largo, tal como por ejemplo filtros de paso largo que atenúan longitudes de onda de luz de 1600 nm o menos, tal como 1550 nm o menos, tal como 1500 nm o menos, tal como 1450 nm o menos, tal como 1400 nm o menos, tal como 1350 nm o menos, tal como 1300 nm o menos, tal como 1000 nm o menos, tal como 950 nm o menos, tal como 900 nm o menos, tal como 850 nm o menos, tal como 800 nm o menos, tal como 750 nm o menos, tal como 700 nm o menos, tal como 650 nm o menos, tal como 600 nm o menos, tal como 550 nm o menos, tal como 500 nm o menos e incluyen un filtro de paso largo que atenúa longitudes de onda de luz de 450 nm o menos. En otros casos más, los filtros ópticos son filtros de

paso corto, tal como por ejemplo filtros de paso corto que atenúan longitudes de onda de luz de 200 nm o más, tal como 250 nm o más, tal como 300 nm o más, tal como 350 nm o más, tal como 400 nm o más, tal como 450 nm o más, tal como 500 nm o más, tal como 550 nm o más e incluyen filtros de paso corto que atenúan longitudes de onda de luz de 600 nm o más.

5

En otras modalidades, el separador de longitud de onda es una rejilla de difracción. Las rejillas de difracción pueden incluir, pero no se limitan a rejillas de difracción de transmisión, dispersivas o reflectantes. La separación adecuada de la rejilla de difracción puede variar en dependencia de la configuración de la fuente de luz, el campo de detección y el sensor de formación de imágenes y otros protocolos de ajuste óptico presentes (por ejemplo, lentes de enfoque), que varían de 0,01 μm a 10 μm , tal como de 0,025 μm a 7,5 μm , tal como de 0,5 μm a 5 μm , tal como de 0,75 μm a 4 μm , tal como de 1 μm a 3,5 μm e incluyen de 1,5 μm a 3,5 μm .

10

En algunas modalidades, cada sensor de formación de imágenes se acopla operativamente a una o más fuentes de luz para iluminar la corriente de flujo en el campo de detección. En algunas modalidades, la fuente de luz es una fuente de luz de banda ancha, que emite luz que tiene una gama amplia de longitudes de onda, tal como por ejemplo, que abarca 50 nm o más, tal como 100 nm o más, tal como 150 nm o más, tal como 200 nm o más, tal como 250 nm o más, tal como 300 nm o más, tal como 350 nm o más, tal como 400 nm o más e incluye que abarca 500 nm o más. Por ejemplo, una fuente de luz de banda ancha adecuada emite luz que tiene longitudes de onda de 200 nm a 1500 nm. Otro ejemplo de una fuente de luz de banda ancha adecuada incluye una fuente de luz que emite luz que tiene longitudes de onda de 400 nm a 1000 nm. Puede emplearse cualquier protocolo de fuente de luz de banda ancha conveniente, tal como una lámpara halógena, lámpara de arco de deuterio, lámpara de arco de xenón, fuente de luz de banda ancha acoplada a fibra estabilizada, un LED de banda ancha con espectro continuo, diodo emisor superluminiscente, diodo emisor de luz semiconductor, fuente de luz blanca LED de amplio espectro, una fuente de luz blanca integrada multi-LED, entre otras fuentes de luz de banda ancha o cualquier combinación de las mismas.

15

20

25

En otras modalidades, la fuente de luz es una fuente de luz de banda estrecha que emite una longitud de onda particular o una estrecha gama de longitudes de onda. En algunos casos, las fuentes de luz de banda estrecha emiten luz que tiene una estrecha gama de longitudes de onda, tal como por ejemplo, 50 nm o menos, tal como 40 nm o menos, tal como 30 nm o menos, tal como 25 nm o menos, tal como 20 nm o menos, tal como 15 nm o menos, tal como 10 nm o menos, tal como 5 nm o menos, tal como 2 nm o menos e incluyen fuentes de luz que emiten una longitud de onda de luz específica (es decir, luz monocromática). Puede emplearse cualquier protocolo de fuente de luz de banda estrecha conveniente, tal como un LED de longitud de onda estrecha, un diodo láser o una fuente de luz de banda ancha acoplada a uno o más filtros ópticos de paso de banda, rejillas de difracción, monocromadores o cualquier combinación de los mismos.

30

35

Los sistemas objeto pueden incluir una o más fuentes de luz, como se desee, tal como dos o más fuentes de luz, tal como tres o más fuentes de luz, tal como cuatro o más fuentes de luz, tal como cinco o más fuentes de luz e incluyen diez o más fuentes de luz. La fuente de luz puede incluir una combinación de tipos de fuentes de luz, por ejemplo, cuando se emplean dos fuentes de luz, una primera fuente de luz puede ser una fuente de luz blanca de banda ancha (por ejemplo, LED de luz blanca de banda ancha) y la segunda fuente de luz puede ser una fuente de luz de infrarrojo cercano de banda ancha (por ejemplo, LED de IR cercano de banda ancha). En otros casos, cuando se emplean dos fuentes de luz, una primera fuente de luz puede ser una fuente de luz blanca de banda ancha (por ejemplo, LED de luz blanca de banda ancha) y la segunda fuente de luz puede ser una fuente de luz de espectro estrecho (por ejemplo, una fuente de luz visible de banda estrecha o LED de IR cercano). En otros casos, la fuente de luz es una pluralidad de fuentes de luz de banda estrecha cada una que emite longitudes de onda específicas, tal como una matriz de dos o más LED, tal como una matriz de tres o más LED, tal como una matriz de cinco o más LED, que incluye una matriz de diez o más LED.

40

45

50

En algunas modalidades, las fuentes de luz emiten luz que tiene longitudes de onda que varían de 200 nm a 1500 nm, tal como de 250 nm a 1250 nm, tal como de 300 nm a 1000 nm, tal como de 350 nm a 900 nm e incluyen de 400 nm a 800 nm. Por ejemplo, la fuente de luz puede incluir una fuente de luz de banda ancha que emite luz que tiene longitudes de onda de 200 nm a 900 nm. En otros casos, la fuente de luz incluye una pluralidad de fuentes de luz de banda estrecha que emiten longitudes de onda que varían de 200 nm a 900 nm. Por ejemplo, la fuente de luz puede ser una pluralidad de LED de banda estrecha (1 nm - 25 nm) cada uno que emite luz independientemente que tiene un intervalo de longitudes de onda entre 200 nm y 900 nm. En algunas modalidades, la fuente de luz de banda estrecha es una o más lámparas de banda estrecha que emiten luz en el intervalo de 200 nm a 900 nm, tal como una lámpara de cadmio de banda estrecha, lámpara de cesio, lámpara de helio, lámpara de mercurio, lámpara de mercurio-cadmio, lámpara de potasio, lámpara de sodio, lámpara de neón, lámpara de zinc o cualquier combinación de las mismas.

55

60

En ciertas modalidades, la fuente de luz es una fuente de luz estroboscópica donde la corriente de flujo se ilumina con flash de luz periódicos. En dependencia de la fuente de luz (por ejemplo, lámpara de flash, láser pulsado), la frecuencia de la luz estroboscópica puede variar, y puede ser 0,01 kHz o más, tal como 0,05 kHz

65

o más, tal como 0,1 kHz o más, tal como 0,5 kHz o más, tal como 1 kHz o más, tal como 2,5 kHz o más, tal como 5 kHz o más, tal como 10 kHz o más, tal como 25 kHz o más, tal como 50 kHz o más e incluye 100 kHz o más. En estas modalidades, la luz estroboscópica puede acoplarse operativamente a un procesador que tiene un generador de frecuencia que regula la frecuencia estroboscópica. En algunos casos, el generador de frecuencia se acopla al generador de accionamiento de las gotitas de manera que la luz estroboscópica se sincroniza con la generación de gotitas. En otros casos, el generador de frecuencia de la luz estroboscópica se acopla operativamente al uno o más sensores ópticos de manera que la frecuencia de la luz estroboscópica se sincroniza con la frecuencia de captura de imágenes. En ciertos casos, las fuentes de luz estroboscópica y los controladores de frecuencia adecuados incluyen, pero no se limitan a los descritos en las patentes de Estados Unidos Núms. 5,700,692 y 6,372,506. Las fuentes de luz estroboscópica y pulsada también se describen en Sorenson, y otros Cytometry, Vol. 14, Núm. 2, páginas 115-22 (1993); Wheelless, y otros The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 24, Núm. 1, páginas 265-268 (1976).

Como se resumió anteriormente, los sistemas incluyen uno o más procesadores acoplados operativamente a los sensores de formación de imágenes donde los procesadores se configuran para generar una señal de datos a partir de las imágenes capturadas y para ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos. En modalidades, el procesador se configura para ejecutar instrucciones desde la memoria para ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en base a la señal de datos derivada de las imágenes capturadas. Los parámetros del citómetro de flujo que pueden ajustarse de acuerdo con las modalidades de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a presión hidrostática, tensión de carga de las gotas, tensión de las placas de desviación, valor de corrección de carga, retardo de las gotas, frecuencia de accionamiento de las gotas, amplitud de las gotas y fase de carga. El procesador se acopla operativamente a una o más etapas de soporte y el posicionamiento de las etapas de soporte puede ajustarse en respuesta a la señal de datos derivada de las imágenes capturadas.

En las modalidades, los procesadores incluyen una memoria que tiene una pluralidad de instrucciones para realizar las etapas de los métodos objeto (como se describe con mayor detalle más abajo), tal como iluminar una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección con una fuente de luz, capturar uno o más imágenes de la corriente de flujo, generar una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo en base a las imágenes capturadas, y ajustar los parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos. Los sistemas objeto pueden incluir tanto componentes de hardware como de software, donde los componentes de hardware pueden tomar la forma de una o más plataformas, por ejemplo, en forma de servidores, de manera que los elementos funcionales, es decir, aquellos elementos del sistema que llevan a cabo funciones específicas (tales como gestionar la entrada y salida de información, procesar información, etc.) del sistema pueden llevarse a cabo mediante la ejecución de aplicaciones de software en y a través de una o más plataformas informáticas representadas del sistema. El procesador incluye una memoria que tiene instrucciones almacenadas en el mismo para realizar las etapas de los métodos objeto que incluyen iluminar una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección con una fuente de luz, capturar una o más imágenes de la corriente de flujo, generar una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo en base a las imágenes capturadas, y ajustar los parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos.

En modalidades, el procesador se configura para generar una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo a partir de las imágenes capturadas. En los campos de detección donde la corriente de flujo es continua, el procesador puede configurarse para generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo, las dimensiones de la corriente de flujo tal como el ancho de la corriente de flujo, así como también la velocidad de flujo y la turbulencia de flujo. En los campos de detección donde la corriente de flujo se compone de gotitas discretas, el procesador puede configurarse para generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo, tamaño de las gotas que incluye el diámetro y volumen de las gotas, la frecuencia de accionamiento de las gotas, la amplitud de las gotas así como también la uniformidad del tamaño y la frecuencia de las gotas. En ciertas modalidades, el procesador puede configurarse para generar una señal de datos correspondiente a la relación del tamaño de la corriente de flujo en comparación con el tamaño esperado de la corriente de flujo en base a las características empíricas del citómetro de flujo y los datos introducidos por el usuario. En otras modalidades, el procesador puede configurarse para evaluar las imágenes capturadas para determinar si una corriente de flujo está presente o ausente en un campo de detección particular. En otras modalidades, el procesador puede configurarse para evaluar las imágenes capturadas de la corriente de flujo para determinar el tamaño del orificio de la boquilla de la célula de flujo.

El procesador se acopla operativamente a un sensor de formación de imágenes que captura imágenes de la corriente de flujo en un campo de detección y genera una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo. Por ejemplo, el procesador puede tomar las imágenes capturadas de la corriente de flujo en el campo de detección y mapear la posición espacial de la corriente de flujo en un plano X-Y. En algunos casos, la posición de la corriente de flujo en el plano X-Y se compara con la posición espacial del eje vertical de la boquilla de la célula de flujo para determinar la posición de la corriente de flujo con respecto al eje vertical formado por la boquilla de la célula de flujo. En base a la posición espacial

determinada de la corriente de flujo en el campo de detección, el procesador genera una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo.

En estas modalidades, la señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo puede usarse por el procesador para ajustar automáticamente uno o más parámetros del citómetro de flujo. En algunos casos, la señal de datos se usa para ajustar la posición de una etapa de soporte que tiene uno o más recipientes para recoger partículas, tal como para la clasificación de células. El procesador genera una señal de datos correspondiente a la posición de la corriente de flujo y ajusta la posición de una etapa de soporte de manera que los recipientes de recogida en la etapa de soporte se alinean con la trayectoria de la corriente de flujo. Por ejemplo, el procesador puede configurarse para mapear la posición de la corriente de flujo en cada campo de detección en un plano X-Y, mapear la posición del recipiente en el plano X-Y y hacer coincidir la posición del recipiente en el plano X-Y con la posición de la corriente de flujo en el plano X-Y para alinear el recipiente de recogida con la corriente de flujo. En algunos casos, los sistemas objeto se configuran para mapear la posición de la corriente de flujo en dos campos de detección. En estos casos, el procesador mapea la posición espacial de la corriente de flujo en el primer campo de detección en el plano X-Y y mapea la posición espacial de la corriente de flujo en el segundo campo de detección en el plano X-Y. En base a las posiciones mapeadas de la corriente de flujo en el primer y segundo campos de detección, el procesador se configura para generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo en el citómetro de flujo.

El procesador genera una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo y ajusta automáticamente la posición de una etapa de soporte en un plano X-Y para optimizar la recogida de la corriente de flujo. Por ejemplo, optimizar la recogida puede incluir reducir el número de partículas de la corriente de flujo no recogidas por los recipientes en la etapa de soporte debido a la desalineación de la corriente de flujo con los recipientes de recogida. Por ejemplo, el número de partículas no recogidas por los recipientes en la etapa de soporte debido a la desalineación se reduce en 5 % o más en comparación con un recipiente en una etapa de soporte no ajustada en respuesta a la señal de datos, por ejemplo en 10 % o más, tal como 15 % o más, tal como 20 % o más, tal como 25 % o más, tal como 35 % o más, tal como 50 % o más, tal como 75 % o más, tal como 90 % o más, tal como 95 % o más e incluye en 99 % o más. Dicho de otra manera, el procesador en ciertos casos alinea automáticamente la posición de la etapa de soporte en respuesta a la señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo de manera que el número de partículas recogidas por el recipiente aumenta en 5 % o más en comparación con un recipiente en una etapa de soporte no ajustada en respuesta a la señal de datos, tal como en 10 % o más, tal como 15 % o más, tal como 20 % o más, tal como 25 % o más, tal como 35 % o más, tal como 50 % o más, tal como 75 % o más, tal como 90 % o más, tal como 95 % o más e incluye en 99 % o más. En otros casos, ajustar la posición de la etapa de soporte que tiene recipientes para recoger partículas cargadas durante la clasificación de células puede aumentarse en comparación con la recogida con una etapa de soporte no ajustada en respuesta a la señal de datos en 2 veces o más, tal como 3 veces o más, tal como 5 veces o más e incluye en 10 veces o más.

En algunas modalidades, una etapa de soporte se coloca aguas abajo de las placas deflectoras e incluye recipientes para recoger células clasificadas que se han separado en base a la carga (es decir, positiva, negativa y neutra). En algunos casos, la estructura de soporte puede incluir tres o más recipientes. En otros casos, la estructura de soporte incluye un solo recipiente dividido en tres o más compartimentos para recoger las células clasificadas. Un sensor de formación de imágenes se configura para capturar imágenes de la corriente de flujo en un campo de detección aguas abajo desde las placas deflectoras y un procesador acoplado operativamente al sensor de formación de imágenes genera una señal de datos correspondiente a las posiciones espaciales de las corrientes de flujo. En estas modalidades, el procesador toma las imágenes capturadas de cada corriente de flujo y mapea la posición espacial de la corriente de flujo en un plano X-Y. En algunos casos, la posición de la corriente de flujo en el plano X-Y se compara con la posición de la corriente de flujo antes de entrar en las placas deflectoras para determinar la desviación debida a los efectos de las placas deflectoras. En estas modalidades, el procesador puede generar una señal de datos distinta correspondiente a la posición de la corriente de flujo de partículas neutras, la corriente de flujo de partículas negativas y la corriente de flujo de partículas positivas, o cualquier combinación de las mismas. En un ejemplo, el procesador genera una señal de datos que corresponde a la posición de la corriente de flujo de partículas neutras después de la desviación por las placas deflectoras. En otro ejemplo, el procesador genera una señal de datos que corresponde a la posición de la corriente de flujo de partículas negativas después de la desviación por las placas deflectoras. En otro ejemplo, el procesador genera una señal de datos que corresponde a la posición de la corriente de flujo de partículas positivas que vienen desde las placas deflectoras. En otro ejemplo, el procesador genera una señal de datos que corresponde a las posiciones de la corriente de flujo de las partículas positivas, las partículas negativas y las partículas neutras.

En base a las posiciones espaciales determinadas de cada corriente de flujo, el procesador ajusta automáticamente uno o más parámetros del citómetro de flujo. Por ejemplo, la señal de datos puede usarse para ajustar la posición de una etapa de soporte que tiene recipientes para recoger las partículas positivas, las partículas negativas y las partículas neutras. En estos casos, el procesador genera una señal de datos

5 correspondiente a las posiciones espaciales de cada corriente de flujo (es decir, corriente de partículas neutras, corriente de partículas positivas y corriente de partículas negativas) y ajusta automáticamente la posición de la etapa de soporte para alinear los recipientes de recogida con cada una de las corrientes de flujo para optimizar la recogida. Por ejemplo, la posición de la etapa de soporte puede ajustarse automáticamente para alinear los recipientes de recogida con cada corriente de flujo de manera que el número de partículas recogidas por los recipientes aumenta en 5 % o más en comparación con un recipiente en una estructura de soporte no ajustada en respuesta a la señal de datos, tal como en 10 % o más, tal como 15 % o más, tal como 20 % o más, tal como 25 % o más, tal como un 35 % o más, tal como 50 % o más, tal como 75 % o más, tal como 90 % o más, tal como 95 % o más e incluye 99% o más.

10 Como se resumió anteriormente, los sistemas de acuerdo con las modalidades de la presente descripción incluyen uno o más procesadores que se automatizan para ajustar los parámetros de un citómetro de flujo en base a las señales de datos derivadas de imágenes capturadas de la corriente de flujo del citómetro de flujo. En determinadas modalidades, los parámetros del citómetro de flujo que pueden ajustarse incluyen presión de fluido de la vaina, presión hidrostática, tensión de carga de las gotitas, tensión de las placas de desviación, valor de corrección de carga, retardo de las gotas, frecuencia de accionamiento de las gotas, amplitud de las gotas y fase de carga.

15 En algunas modalidades, el procesador puede configurarse para ajustar la presión hidrostática en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunos casos, la presión hidrostática puede aumentarse tal como en 0,1 psi o más, tal como 0,5 psi o más, tal como en 1 psi o más, tal como en 5 psi o más, tal como en 10 psi o más, tal como en 25 psi o más, tal como en 50 psi o más, tal como en 75 psi o más e incluye aumentar la presión hidrostática en 100 psi o más. Por ejemplo, la presión hidrostática puede aumentarse en 1 % o más, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más e incluye aumentar la presión hidrostática en 90 % o más. En otros casos, la presión hidrostática se reduce, tal como en 0,1 psi o más, tal como 0,5 psi o más, tal como en 1 psi o más, tal como en 5 psi o más, tal como en 10 psi o más, tal como en 25 psi o más, tal como en 50 psi o más, tal como en 75 psi o más e incluye reducir la presión hidrostática en 100 psi o más. Por ejemplo, la presión hidrostática puede reducirse en 1 % o más, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más e incluye reducir la presión hidrostática en 90 % o más.

20 En otras modalidades, el procesador puede configurarse para ajustar la tensión de carga de las gotas en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunos casos, la tensión de carga de las gotas aumenta, tal como en 0,01 V o más, tal como 0,05 V o más, tal como 0,1 V o más, tal como en 0,5 V o más, tal como en 1 V o más, tal como en 5 V o más, tal como en 10 V o más, tal como en 15 V o más, tal como en 25 V o más, tal como en 50 V o más e incluye aumentar la tensión de carga de las gotas en 75 V o más. Por ejemplo, la tensión de carga de las gotas puede aumentarse en 1 % o más, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más e incluye aumentar la tensión de carga de las gotas en 90 % o más. En otros casos, la tensión de carga de las gotas se reduce, tal como en 0,01 V o más, tal como 0,05 V o más, tal como 0,1 V o más, tal como 0,5 V o más, tal como en 1 V o más, tal como en 5 V o más, tal como en 10 V o más, tal como en 15 V o más, tal como en 25 V o más, tal como en 50 V o más e incluye reducir la tensión de carga de las gotas en 75 V o más. Por ejemplo, la tensión de carga de las gotas puede reducirse en 1 % o más, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más e incluye reducir la tensión de carga de las gotas en 90 % o más.

25 En otras modalidades, el procesador puede configurarse para ajustar la tensión de las placas de desviación en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinada en base a las imágenes capturadas. En algunos casos, la tensión de las placas de desviación aumenta, tal como en 5 V o más, tal como en 10 V o más, tal como en 50 V o más, tal como en 100 V o más, tal como en 250 V o más, tal como en 500 V o más, tal como en 1000 V o más e incluye aumentar la tensión de carga de las gotas en 2000 V o más. Por ejemplo, la tensión de las placas de desviación puede aumentarse en 1 % o más, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más e incluye aumentar la tensión de las placas de desviación en 90 % o más. En otros casos, la tensión de carga de las gotas se reduce, tal como en 0,5 V o más, tal como en 5 V o más, tal como en 10 V o más, tal como en 50 V o más, tal como en 100 V o más, tal como en 250 V o más, tal como en 500 V o más, tal como en 1000 V o más e incluye reducir la tensión de las placas de desviación en 2000 V o más. Por ejemplo, la tensión de las placas de desviación puede reducirse en 1 % o más, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más e incluye reducir la tensión de las placas de desviación en 90 % o más.

En otras modalidades, el procesador puede configurarse para ajustar la frecuencia de accionamiento de las gotas en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinada en base a las imágenes capturadas. En algunos casos, la frecuencia de accionamiento de las gotas aumenta, tal como en 0,01 Hz o más, tal como en 0,05 Hz o más, tal como en 0,1 Hz o más, tal como en 0,25 Hz o más, tal como en 0,5 Hz o más, tal como en 1 Hz o más, tal como en 2,5 Hz o más, tal como en 5 Hz o más, tal como en 10 Hz o más e incluye en 25 Hz o más. Por ejemplo, la frecuencia de accionamiento de las gotas puede aumentarse en 1 % o más, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más e incluye aumentar la frecuencia de accionamiento de las gotas en 90 % o más. En otros casos, la frecuencia de accionamiento de las gotas se reduce, tal como en 0,01 Hz o más, tal como en 0,05 Hz o más, tal como en 0,1 Hz o más, tal como en 0,25 Hz o más, tal como en 0,5 Hz o más, tal como en 1 Hz o más, tal como en 2,5 Hz o más, tal como en 5 Hz o más, tal como en 10 Hz o más e incluye en 25 Hz o más. Por ejemplo, la frecuencia de accionamiento de las gotas puede reducirse en 1 % o más, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más e incluye reducir la frecuencia de las gotas en 90 % o más. En otras modalidades, el procesador puede configurarse para ajustar el retardo de las gotas en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunos casos, el retardo de las gotas aumenta, tal como en 0,01 microsegundos o más, tal como en 0,05 microsegundos o más, tal como en 0,1 microsegundos o más, tal como en 0,3 microsegundos o más, tal como en 0,5 microsegundos o más, tal como en 1 microsegundo o más, tal como 2,5 microsegundos o más, tal como 5 microsegundos o más, tal como en 7,5 microsegundos o más e incluye aumentar el retardo de las gotas en 10 microsegundos o más. Por ejemplo, el retardo de las gotas puede aumentarse en 1 % o más, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más e incluye aumentar el retardo de las gotas en 90 % o más. En otros casos, la frecuencia de las gotas se reduce, tal como en 0,01 microsegundos o más, tal como en 0,05 microsegundos o más, tal como en 0,1 microsegundos o más, tal como en 0,3 microsegundos o más, tal como en 0,5 microsegundos o más, tal como en 1 microsegundo o más, tal como en 2,5 microsegundos o más, tal como en 5 microsegundos o más, tal como en 7,5 microsegundos o más e incluye reducir el retardo de las gotas en 10 microsegundos o más. Por ejemplo, el retardo de las gotas puede reducirse en 1 % o más, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más e incluye reducir el retardo de las gotas en 90 % o más.

En otras modalidades, el procesador puede configurarse para ajustar la amplitud de las gotas en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunos casos, la amplitud de las gotas aumenta, tal como en 0,01 volts o más, tal como en 0,025 volts o más, tal como en 0,05 volts o más, tal como en 0,1 volts o más, tal como en 0,25 volts o más, tal como en 0,5 volts o más e incluye aumentar la amplitud de las gotas en 1 volt o más. Por ejemplo, la amplitud de las gotas puede aumentarse en 1 % o más, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más e incluye aumentar la amplitud de las gotas en 90 % o más. En otros casos, la amplitud de las gotas se reduce, tal como en 0,01 volts o más, tal como en 0,025 volts o más, tal como en 0,05 volts o más, tal como en 0,075 volts o más, tal como en 0,1 volts o más, tal como en 0,25 volts o más e incluye reducir la amplitud de las gotas en 1 volt o más. Por ejemplo, la amplitud de las gotas puede reducirse en 1 % o más, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más e incluye reducir la amplitud de las gotas en 90 % o más.

En algunas modalidades, el procesador se acopla operativamente a un sensor de formación de imágenes que captura imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección y genera una señal de datos correspondiente a las dimensiones físicas de la corriente de flujo en base a las imágenes capturadas. Cuando la corriente de flujo es una corriente continua, en algunos casos el procesador se configura para tomar las imágenes capturadas y generar una señal de datos correspondiente al ancho de la corriente de flujo. En los campos de detección donde la corriente de flujo se compone de gotitas discretas, en algunos casos el procesador se configura para generar una señal de datos correspondiente al diámetro de las gotitas.

En ciertas modalidades, el procesador puede configurarse para comparar las dimensiones físicas de la corriente de flujo determinada a partir de las imágenes capturadas con las dimensiones esperadas en base a las características empíricas del citómetro de flujo (tal como el tamaño del orificio de la boquilla de la célula de flujo y la presión de fluido de la vaina) y los parámetros introducidos por el usuario. En estas modalidades, el procesador se configura para generar una señal de datos correspondiente a la relación de las dimensiones físicas de la corriente de flujo en comparación con las dimensiones de la corriente de flujo esperadas en base a las características empíricas del citómetro de flujo y los parámetros introducidos por el usuario. Por ejemplo, el procesador puede configurarse para generar una señal de datos que indica que la corriente de flujo es 99 % o menos del tamaño esperado de la corriente de flujo en base a las características empíricas del citómetro de flujo y los parámetros introducidos por el usuario, tal como 95 % o menos, tal como 90 % o menos, tal como 85 % o menos, tal como 80 % o menos, tal como 75 % o menos, tal como 50 % o menos, tal

como 25 % o menos e incluye 10 % o menos del tamaño esperado de la corriente de flujo. En otras modalidades, el procesador puede configurarse para generar una señal de datos que indica que la corriente de flujo es más del tamaño esperado en base a las características empíricas del citómetro de flujo y los parámetros introducidos por el usuario, tal como que es 105 % o más del tamaño de la corriente de flujo, tal como 110 % o más, tal como 125 % o más e incluye 150 % o más. En estas modalidades, el procesador puede configurarse para automatizar ajustes a uno o más parámetros del citómetro de flujo en base a la señal de datos correspondiente a la relación del tamaño de la corriente de flujo a partir de las imágenes capturadas y el tamaño esperado de la corriente de flujo en base a características empíricas del citómetro de flujo y entrada del usuario. Por ejemplo, el procesador puede configurarse para ajustar automáticamente la velocidad de bombeo, la presión hidrostática y la frecuencia de accionamiento de las gotas en respuesta a la relación determinada.

En ciertos casos, el procesador se configura para determinar un diámetro de abertura de la boquilla de la célula de flujo. En estas modalidades, el procesador se acopla operativamente a un sensor de formación de imágenes que captura imágenes de la corriente de flujo en el orificio de la boquilla de la célula de flujo y genera una señal de datos correspondiente a las dimensiones físicas de la corriente de flujo. En base a la señal de datos correspondiente a las dimensiones físicas de la corriente de flujo, el procesador se configura para determinar el diámetro de abertura de la boquilla de la célula de flujo. En algunos casos, en base a la señal de datos correspondiente a las dimensiones físicas de la corriente de flujo el procesador puede determinar que el diámetro de abertura de la boquilla de la célula de flujo es 25 μm o más, tal como 35 μm o más, tal como 45 μm o más, tal como 50 μm o más, tal como 60 μm o más, tal como 75 μm o más, tal como 100 μm o más e incluye 150 μm o más. Por ejemplo, el sistema puede configurarse para determinar un diámetro de abertura de la boquilla de la célula de flujo a partir de las dimensiones físicas de la corriente de flujo que varía de 25 μm a 200 μm , tal como de 35 μm a 175 μm , tal como de 50 μm a 150 μm e incluye de 75 μm a 100 μm .

En ciertos casos, el diámetro de abertura de la boquilla se determina en base al ancho de la corriente de flujo. En otros casos, el diámetro de abertura de la boquilla se determina en base al volumen de las gotitas.

El procesador puede, en ciertos casos, configurarse para ajustar automáticamente uno o más parámetros en base al diámetro de abertura de la boquilla determinado, tal como por ejemplo, la presión hidrostática, la presión de fluido de la vaina, carga de las gotas, tensión de desviación, valor de corrección de carga, retardo de las gotas, frecuencia de accionamiento de las gotas, fase de carga de amplitud de la gotas y cualquier combinación de los mismos, como se discutió anteriormente.

En algunas modalidades, el procesador puede configurarse para ajustar automáticamente la frecuencia de accionamiento de las gotas en respuesta a la señal de datos correspondiente al tamaño del orificio de la boquilla de la célula de flujo determinado mediante el uso de las imágenes capturadas de la corriente de flujo. Por ejemplo, la frecuencia de accionamiento de las gotas puede aumentarse en 0,01 Hz o más, tal como en 0,05 Hz o más, tal como en 0,1 Hz o más, tal como en 0,25 Hz o más, tal como en 0,5 Hz o más, tal como en 1 Hz o más, tal como en 2,5 Hz o más, tal como en 5 Hz o más, tal como en 10 Hz o más e incluye en 25 Hz o más. En otros casos, el procesador se configura para reducir automáticamente la frecuencia de accionamiento de las gotas en respuesta al tamaño del orificio de la boquilla de la célula de flujo determinado mediante el uso de las imágenes capturadas de la corriente de flujo, tal como en 0,01 Hz o más, tal como en 0,05 Hz o más, tal como en 0,1 Hz o más, tal como en 0,25 Hz o más, tal como en 0,5 Hz o más, tal como en 1 Hz o más, tal como en 2,5 Hz o más, tal como en 5 Hz o más, tal como en 10 Hz o más e incluye en 25 Hz o más.

En otras modalidades, el procesador puede configurarse para ajustar automáticamente la presión de fluido de la vaina en respuesta a la señal de datos correspondiente al tamaño del orificio de la boquilla de la célula de flujo determinado mediante el uso de las imágenes capturadas de la corriente de flujo. Por ejemplo, la presión de fluido de la vaina puede aumentarse en 0,001 psi o más, tal como en 0,005 psi o más, tal como en 0,01 psi o más, tal como en 0,05 psi o más, tal como en 0,1 psi o más, tal como en 0,5 psi o más, tal como en 1 psi o más, tal como en 5 psi o más, tal como en 10 psi o más, tal como en 25 psi o más, tal como en 50 psi o más, tal como en 75 psi o más e incluye aumentar la presión de fluido de la vaina en 100 psi o más. En otros casos, el procesador se configura para reducir automáticamente la presión de fluido de la vaina en respuesta al tamaño del orificio de la boquilla de la célula de flujo determinado mediante el uso de las imágenes capturadas de la corriente de flujo, tal como en 0,1 psi o más, tal como en 0,5 psi o más, tal como en 1 psi o más, tal como en 5 psi o más, tal como en 10 psi o más, tal como en 25 psi o más, tal como en 50 psi o más, tal como en 75 psi o más e incluye reducir la presión de fluido de la vaina en 100 psi o más.

En algunas modalidades, los sistemas de interés incluyen un sensor de formación de imágenes configurado para capturar imágenes en un campo de detección en el punto de ruptura de la corriente de flujo. El término "punto de ruptura" se usa en la presente descripción en su sentido convencional para referirse al punto en el cual la corriente de flujo continuo comienza a formar gotitas. En estas modalidades, los sistemas objeto incluyen un procesador acoplado operativamente al sensor de formación de imágenes y configurado para

generar una señal de datos correspondiente al volumen de las gotas de las gotitas aguas abajo desde el punto de ruptura. El procesador toma las imágenes capturadas de las gotitas de la corriente de flujo y mide el volumen de las gotas. La señal de datos correspondiente al volumen de las gotas puede usarse por el procesador para ajustar automáticamente uno o más parámetros del citómetro de flujo.

5

En algunas modalidades, la señal de datos correspondiente al volumen de las gotas se usa por el procesador para ajustar automáticamente la frecuencia de accionamiento de las gotas de la corriente de flujo. Por ejemplo, el procesador puede configurarse para reducir automáticamente la frecuencia de accionamiento de las gotas, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más, tal como en 90 % o más, tal como en 95 % o más e incluye en 99 % o más. En otros casos, el procesador se configura para reducir automáticamente la frecuencia de accionamiento de las gotas en 2 veces o más en respuesta a la señal de datos correspondiente al volumen de las gotas determinado, tal como en 3 veces o más, tal como en 4 veces o más, tal como en 5 veces o más e incluye en 10 veces o más. En otros casos, el procesador se configura para aumentar automáticamente la frecuencia de accionamiento de las gotas, tal como en 5 % o más en respuesta a la señal de datos correspondiente al volumen de las gotas, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más, tal como en 90 % o más, tal como en 95 % o más e incluye en 99 % o más. En otros casos, el procesador se configura para aumentar automáticamente la frecuencia de accionamiento de las gotas en 2 veces o más, tal como en 3 veces o más, tal como en 4 veces o más, tal como en 5 veces o más e incluye en 10 veces o más.

10

15

20

En otras modalidades, la señal de datos correspondiente al volumen de las gotas se usa por el procesador para automatizar el volumen de recogida de la muestra durante la clasificación de células. Por ejemplo, el volumen deseado para cada muestra recogida puede introducirse en el procesador y en base a la señal de datos correspondiente al volumen de las gotas, el citómetro de flujo puede automatizarse para detener la recogida de la muestra después de una cantidad predeterminada de tiempo, tal como por al retirar el recipiente de recogida o al interrumpir la corriente de flujo mediante el citómetro de flujo.

25

En algunas modalidades, el procesador puede configurarse para determinar la presencia o ausencia de una corriente de flujo en un campo de detección. Los sistemas de interés pueden incluir un sensor de formación de imágenes configurado para capturar imágenes de la corriente de flujo del citómetro de flujo que sale del orificio de la boquilla de la célula de flujo y un procesador acoplado operativamente al sensor de formación de imágenes configurado para evaluar las imágenes capturadas para determinar si una corriente de flujo está presente o no presente en el campo de detección. Por ejemplo, determinar si una corriente de flujo está presente o no presente en las imágenes capturadas del orificio de la boquilla de la célula de flujo puede usarse para determinar si la célula de flujo tiene una boquilla obstruida. En estas modalidades, las imágenes capturadas por los sensores de formación de imágenes se evalúan por el procesador y si se detecta una corriente de flujo en las imágenes por el procesador, el procesador se configura para generar una señal que indica la presencia de una corriente de flujo. Por otro lado, si después de evaluar las imágenes capturadas, el procesador determina que la corriente de flujo está ausente en las imágenes capturadas, el procesador puede configurarse para generar una señal que indica la ausencia de una corriente de flujo.

30

35

40

Cuando el procesador determina que no está presente la corriente de flujo en las imágenes capturadas, en ciertas modalidades, los sistemas objeto se configuran para alertar automáticamente a un usuario de que la ausencia de la corriente de flujo es un resultado de un mal funcionamiento del citómetro de flujo, tal como una boquilla obstruida. En estas modalidades, el procesador correlaciona la señal de datos correspondiente a la ausencia de una corriente de flujo con la entrada del usuario sobre si debe esperarse una corriente de flujo. En algunas modalidades, un usuario puede configurar el sistema para tener una configuración de "bucle cerrado" donde la corriente de flujo desde la boquilla se dirige a un receptáculo de desechos sin formar una corriente de flujo. En estas modalidades, el citómetro de flujo no alerta al usuario de un mal funcionamiento (por ejemplo, boquilla obstruida) ya que no se espera una corriente de flujo. Sin embargo, cuando se espera una corriente de flujo (tal como durante el uso normal), el procesador se automatiza para alertar al usuario de un mal funcionamiento si después de evaluar las imágenes capturadas no se detecta corriente de flujo.

45

50

En ciertas modalidades, después de que el procesador ha generado una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo en base a las imágenes capturadas, un módulo de salida que puede comunicar los parámetros del citómetro de flujo puede ajustarse en respuesta a la señal de datos. En algunos casos, el módulo de salida comunica una salida junto con los sistemas objeto al ajustar los parámetros del citómetro de flujo. En otros casos, el módulo de salida comunica los parámetros antes del ajuste y puede requerir la confirmación del ajuste por el usuario. La salida del procesador puede comunicarse al usuario mediante cualquier protocolo conveniente, tal como por ejemplo al visualizarlo en un monitor o al imprimir un informe.

55

60

Como se discutió anteriormente, los sistemas en algunas modalidades incluyen una o más etapas de soporte acopladas operativamente a los procesadores. Las etapas de soporte adecuadas pueden ser cualquier dispositivo de montaje conveniente configurado para mantener en su lugar uno o más componentes de los

65

sistemas objeto, tales como sustrato plano, dispositivos de montaje contorneados, estructuras de soporte cilíndricas o tubulares, soportes de láser o LED, entre otros tipos de estructuras de soporte. La etapa de soporte es un soporte para un dispositivo de iluminación, tal como un láser o un LED. En otros casos, los sistemas incluyen una estructura de soporte para mantener uno o más recipientes para recoger partículas de la corriente de flujo. Por ejemplo, la etapa de soporte puede configurarse para mantener en su lugar recipientes que incluyen, pero no se limitan a tubos de ensayo, tubos cónicos, recipientes multi-compartimentales tales como placas de microtitulación (por ejemplo, placas de 96 pocillos), tubos de centrifuga, tubos de cultivo, microtubos, taponetes, cubetas, frascos, recipientes poliméricos rectilíneos, entre otros tipos de recipientes.

Los sistemas de interés pueden incluir una o más etapas de soporte, como se desee, tales como dos o más, tales como tres o más, tales como cuatro o más y que incluyen cinco o más etapas de soporte. Por ejemplo, el número de etapas de soporte puede variar de 1 a 10 etapas de soporte, tal como de 2 a 7 etapas de soporte e incluyen de 3 a 5 etapas de soporte. Los sistemas de interés incluyen una etapa de soporte. En otras modalidades, los sistemas incluyen dos etapas de soporte. En un ejemplo, los sistemas objeto incluyen una etapa de soporte que tiene un recipiente para recoger gotitas de la corriente de flujo. En otro ejemplo, los sistemas objeto incluyen una etapa de soporte que tiene un láser montado. El sistema sujeto incluye una primera etapa de soporte que tiene un láser montado y una segunda etapa de soporte que tiene un recipiente para recoger gotitas de la corriente de flujo.

Las etapas de soporte son móviles. Por ejemplo, en un ejemplo la etapa de soporte puede moverse para ajustar la posición de los recipientes de recogida en la etapa de soporte de manera que se alinean con la corriente de flujo. En otro ejemplo, la etapa de soporte puede moverse para ajustar la posición de un láser. En algunos casos, la etapa de soporte se mueve en dos dimensiones, tal como en un plano X-Y ortogonal al eje de la corriente de flujo. En otros casos, la estructura de soporte se mueve en tres dimensiones. Cuando la etapa de soporte se configura para moverse, la etapa de soporte puede moverse continuamente o en intervalos discretos. En algunas modalidades, la etapa de soporte se mueve en un movimiento continuo. En otras modalidades, la etapa de soporte se mueve en intervalos discretos, tal como por ejemplo en incrementos de 0,01 micrones o más, tal como 0,05 micrones o más, tal como 0,1 micrones o más, tal como 0,5 micrones o más, tal como 1 micrometro o más, tal como 10 micrones o más, tal como 100 micrones o más, tal como 500 micrones o más, tal como 1 mm o más, tal como 5 mm o más, tal como 10 mm o más e incluye incrementos de 25 mm o más.

Puede emplearse cualquier protocolo de desplazamiento para mover las estructuras de soporte, tal como mover las etapas de soporte con una etapa de traslación accionada por motor, ensamble de traslación de husillo, dispositivo de traslación con engranajes, tal como aquellos que emplean un motor paso a paso, servomotor, motor eléctrico sin escobillas, motor de DC con escobillas, motor de accionamiento de micropasos, motor paso a paso de alta resolución, entre otros tipos de motores.

Ciertas modalidades de la presente descripción pueden describirse con referencia a la Figura 1. En la Figura 1 se ilustra un citómetro de flujo 100 que emplea una modalidad de la presente invención. Como se discutió anteriormente, el citómetro de flujo 100 incluye una célula de flujo 104, un depósito de muestra 106 para proporcionar una muestra de fluido, (por ejemplo, muestra de sangre), a la célula de flujo y un depósito de la vaina 108 para proporcionar un fluido de la vaina a la célula de flujo. El citómetro de flujo 100 se configura para transportar una muestra de fluido que tiene células en una corriente de flujo a la célula de flujo 104 junto con un flujo de laminado de fluido de la vaina. El análisis de la corriente de flujo en una zona de interrogación 103 dentro de la célula de flujo 104 puede usarse para determinar las propiedades de una muestra y controlar los parámetros de clasificación (como se describe en la presente descripción). Los protocolos de interrogación de muestra pueden incluir una fuente de luz (por ejemplo, láser) 112 para iluminar la corriente de flujo y uno o más detectores 109 (por ejemplo, tubos fotomultiplicadores (PMT), dispositivo acoplado cargado (CCD)) o cualquier otro tipo adecuado de dispositivo de detección de luz. Cuando la luz de la fuente de luz cruza la corriente de muestra en la zona de interrogación 103, la luz láser se dispersa por el fluido de la corriente de muestra y, en particular, por cualquier célula presente en la corriente de muestra. Una primera porción de la luz láser dispersada se propagará en la dirección anterior a la intersección a la corriente de muestra (referida en la presente descripción como luz de dispersión directa). Una segunda porción de la luz láser que cruza el punto de interrogación se dispersará en un ángulo diferente de la dirección de propagación (referida en la presente descripción como luz de dispersión lateral). Dentro de la célula de flujo 104, el fluido de la vaina rodea la corriente de células, y el fluido de la vaina combinado y la corriente de células sale de la célula de flujo 104 a través de una boquilla 102 que tiene un orificio 110 como la corriente de flujo 111. La corriente de flujo puede ser un flujo continuo de fluido o una serie de gotitas en dependencia de la acción de un generador de gotitas.

La corriente de flujo 111 sale de la boquilla 102 por el orificio de la boquilla 110 que puede tener cualquier diámetro por ejemplo, 50 μm , 70 μm , 100 μm , o cualquier otro diámetro adecuado. El diámetro de la boquilla afectará las propiedades de una corriente de flujo, tal como las dimensiones de la corriente, el punto de ruptura de las gotitas y el volumen de las gotas. Para visualizar la corriente de flujo 111, una fuente de luz

112, tal como una luz estroboscópica LED, láser o cualquier otro dispositivo de iluminación, puede utilizarse y colocarse opcionalmente en la región de la corriente de fluido de muestra 111. Puede colocarse una cámara 113 u otro dispositivo de recogida de imágenes para capturar una imagen de la corriente de flujo en un primer campo de detección. En algunas modalidades la corriente de flujo puede comprender una corriente continua o una serie de gotitas. Si la corriente de flujo es un flujo continuo de líquido, la imagen capturada por la cámara en el campo de detección puede proporcionar un usuario o controlador con información suficiente para determinar la posición y/o las dimensiones de la corriente de flujo.

En algunos aspectos de esta invención la cámara 113 u otro dispositivo de detección puede afectar alguna acción en el citómetro de flujo 100 en base a la imagen recogida por la cámara 113. Un controlador de configuración 114 que comprende un algoritmo informático puede recibir la imagen de la corriente de flujo y determinar alguna acción a realizar por el citómetro de flujo, que libera ventajosamente al usuario de las tareas de configuración manual. En algunas modalidades, el diámetro de abertura de la boquilla 110 puede determinarse en base a un análisis de imagen de las dimensiones de la corriente de flujo 111 capturado por la cámara 113. En algunas modalidades un controlador de configuración 114 puede conectarse operativamente al citómetro de flujo 100 e iniciar automáticamente el ajuste de una serie de parámetros en el citómetro de flujo en base al diámetro de la boquilla determinado a partir de la imagen recibida por la cámara. Los parámetros pueden incluir cualquier parámetro de citometría de flujo tal como presión hidrostática, carga de las gotas, tensión de desviación, valor de corrección de carga, retardo de las gotas, frecuencia de las gotas, amplitud de las gotas, y fase de las gotas.

El controlador de configuración 114 puede conectarse operativamente a un sistema fluido 115 que puede controlar la velocidad de la corriente de flujo 111 en el citómetro de flujo 100. El controlador de configuración 114 puede iniciar una pausa en el corriente de flujo en base a una imagen recibida de la cámara 113.

La imagen recogida de la cámara 113 de la corriente de flujo 111 en el campo de detección puede proporcionar información adicional acerca de la posición de la corriente de flujo en un plano XY. La cámara puede conectarse operativamente a una o más etapas 116, 119 y la posición de la etapa o etapas puede moverse en respuesta a una señal de la cámara o controlador de configuración conectado a la cámara. Un dispositivo de recogida o un dispositivo emisor de luz tal como un láser 117 puede fijarse a una etapa y alinearse de manera beneficiosa para interceptar la corriente de flujo 111 en respuesta a la imagen de la cámara 113. El dispositivo emisor de luz puede alinearse para maximizar la cantidad de luz recibida por la corriente de flujo. Un dispositivo de recogida 118 puede fijarse a la primera etapa o a una segunda etapa 119 y alinearse para maximizar la recogida de una corriente de flujo u orientar la corriente de flujo con respecto a una 'posición inicial' en el dispositivo de recogida. La alineación automática mejorada del láser o dispositivo de recogida con la corriente de flujo reduce beneficiosamente el ajuste manual de la etapa por el usuario.

Una segunda cámara 120 o dispositivo de recogida de datos puede colocarse debajo de la primera cámara 113 o dispositivo de recogida de datos y configurarse para recoger una imagen en un segundo campo de detección. La segunda cámara puede colocarse ortogonalmente en un plano XY con relación a la primera cámara, u opcionalmente puede colocarse una serie de ópticas en un plano XY de manera que el primer y segundo campos de detección se orienten ortogonalmente. La segunda cámara 120 también puede conectarse operativamente a una o más etapas móviles 116, 119 ya sea directamente o a través del controlador de configuración 114. Los dispositivos de recogida o análisis pueden fijarse a las etapas. El segundo campo de detección puede orientarse ortogonalmente con relación al primer campo de detección. Las imágenes de la segunda cámara pueden usarse para refinar la posición de la corriente de flujo determinada a partir de la primera cámara y proporcionar un posicionamiento mejorado de una o más etapas asociadas con la corriente de flujo. Aunque las cámaras 113 y 120 se muestran como detectores individuales para propósitos ilustrativos, puede usarse una pluralidad de cámaras para detectar la corriente de flujo en una pluralidad de campos de detección. Puede utilizarse una fuente de luz adicional 123 para proporcionar suficiente iluminación para capturar la imagen de la corriente de flujo en esta posición. Alternativamente el láser 117 puede proporcionar suficiente iluminación. Además, pueden colocarse filtros u otras ópticas 121 y 122 en frente de las áreas de recepción de luz de las cámaras 113 y 120, respectivamente, para filtrar cualquier luz o para ajustar la resolución o dirección del campo de detección.

Las imágenes de la primera y/o segunda cámaras 113, 120 pueden analizarse por un controlador de configuración 114 para determinar cualquier número de propiedades de la corriente de flujo, tal como la posición de la corriente de flujo en un campo de detección o las dimensiones de la corriente de flujo. Una señal correspondiente a la ubicación de la corriente de flujo en el campo de detección puede transmitirse a un controlador de configuración 114 o directamente a una etapa móvil 116, 119 e iniciar la alineación automática de dispositivos o recipientes fijados a la etapa con respecto a la corriente de flujo.

La corriente de flujo puede ser una serie de gotitas que se desvían parcialmente por un par de placas de desviación 124 y se convierten en una pluralidad de corrientes 125, 126, 127. Como se ilustra además, el citómetro de flujo puede incluir una pluralidad de recipientes de recogida 118, 128 y 129 para recoger la pluralidad de corrientes de flujo. Los recipientes de recogida pueden ser un solo recipiente con múltiple

pocillos tal como una placa de 96 o 364 pocillos o una serie de recipientes. En el ejemplo mostrado en la Figura 1, las gotitas 127 que se han cargado negativamente en la zona de interrogación serán dirigidas por los potenciales aplicados a las placas de desviación 124 hacia el recipiente de recogida 128. Las gotitas 126 que no se han cargado ni positivamente ni negativamente no se desviarán por los potenciales aplicados a las placas de desviación 124, y por lo tanto continúan a lo largo de su trayectoria original dentro del recipiente de recogida central 118. Las gotitas 125 que se han cargado positivamente serán desviadas por los potenciales aplicados a las placas de desviación 124 hacia el recipiente de recogida 129. La alineación de los recipientes de recogida con respecto a las corrientes de flujo desviadas es esencial para maximizar las recogidas de células clasificadas.

El recipiente o recipientes de recogida pueden alinearse automáticamente al recoger datos de la primera y/o segunda cámaras 113, 120 para determinar la posición de las corrientes de flujo en un plano XY. El(Los) recipiente(s) de recogida pueden fijarse a una etapa móvil 119 en comunicación con el controlador 114 o directamente con la primera o segunda cámaras 113, 120. Las cámaras pueden determinar la posición de la corriente en el campo de detección, y generar una señal al controlador. El controlador 114 puede controlar automáticamente la posición de un recipiente de recogida 118 dispuesto debajo de la corriente de flujo para optimizar la posición del recipiente de recogida con respecto a la corriente de flujo. En algunas modalidades el controlador también puede controlar la magnitud de la carga eléctrica recibida por una porción de las gotitas. La magnitud de la carga eléctrica puede afectar el grado de desviación experimentado por las gotitas y por lo tanto la posición de las gotitas en el plano XY.

El controlador de configuración 118 puede realizar más acciones en dependencia de los parámetros introducidos en el dispositivo. Un aspecto de la invención es la aplicación de un valor de entrada para el de volumen de las gotas en el controlador de configuración 114. El volumen de las gotas puede determinarse por cualquier medio tal como mediciones empíricas de un volumen después de que se ha recogido un número establecido de gotas de un diámetro de la boquilla particular en un período definido de tiempo. Entonces el volumen de las gotas puede introducirse en el controlador de configuración 114. En algunas modalidades el controlador puede provocar que el sistema fluido 115 se detenga después de que se dispense un volumen establecido a un recipiente de recogida 118. Este método mejora beneficiosamente un protocolo de recogida debido a que el uso de un volumen de las gotas calibrado puede proporcionar una determinación más precisa del volumen de recogida que los métodos convencionales que se basan en el conteo de las gotas para controlar los tiempos de recogida. Mediante el uso de los métodos de esta invención y la información del volumen de fluido clasificado disponible, puede implementarse una "regla de detención" adicional para el proceso de clasificación.

En algunos aspectos de esta invención, el controlador de configuración puede usarse para distinguir entre una boquilla obstruida y una boquilla de bucle cerrado diseñada específicamente para no generar una corriente de flujo. La boquilla de "bucle cerrado" tiene una salida que se conecta a un sistema de tubería que va directamente al desecho. No crea una corriente abierta, clasificable, y se usa sólo para análisis. Es importante ser capaz de distinguir esta boquilla de una boquilla de clasificación obstruida que debería crear una corriente abierta, clasificable pero que no es capaz por alguna razón. En algunas modalidades el controlador de configuración detecta eléctricamente cuándo se instala la boquilla de bucle cerrado. La detección eléctrica puede tomar cualquier forma tal como una boquilla de bucle cerrado insertada que proporciona una conexión a tierra a un circuito de resistencia de 'tracción'. Si la boquilla de bucle cerrado se detecta de esta manera, una imagen de una corriente no se espera por la cámara, de manera que una boquilla obstruida no se informa erróneamente cuando no se ve una imagen de corriente. Para clasificar las boquillas, se espera una imagen de corriente, y mediante el uso del valor del área de esa imagen, se determina un tamaño de la boquilla y se ejecutan los valores de configuración del instrumento adecuados para la boquilla. Si no se visualiza una imagen de la corriente y no se detecta una señal eléctrica que indica la presencia de una boquilla de bucle cerrado, se determina que una boquilla de clasificación se instala y obstruye. El controlador de configuración puede iniciar una serie de acciones en este evento. Por ejemplo, el usuario puede notificarse de una boquilla obstruida, el sistema fluido puede pausarse, o puede iniciarse cualquier otra acción.

Métodos para ajustar los parámetros de un citómetro de flujo

Los aspectos de la descripción también incluyen métodos para ajustar uno o más parámetros de un citómetro de flujo. Los métodos de acuerdo con la invención incluyen capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección, determinar una o más propiedades de la corriente de flujo en el campo de detección, generar una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo y ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos.

Como se discutió anteriormente, el término "ajustar" se refiere a cambiar uno o más parámetros funcionales del citómetro de flujo. El ajuste deseado puede variar en términos del objetivo, donde en algunos casos los ajustes deseados son ajustes que finalmente dan como resultado una mayor eficiencia de algún parámetro deseable, por ejemplo, precisión de clasificación de células mejorada, recogida de partículas mejorada,

identificación de mal funcionamiento de componentes (por ejemplo, boquilla de la célula de flujo obstruida), consumo de energía, eficiencia de carga de partículas, carga de partículas más precisa, desviación de partículas mejorada durante la clasificación de células, entre otros ajustes. En las modalidades, los métodos objeto reducen o eliminan completamente la necesidad de entrada del usuario o ajuste manual durante el análisis de la muestra con un citómetro de flujo. En ciertas modalidades, los métodos de interés pueden automatizarse completamente, de manera que los ajustes hechos en respuesta a las señales de datos correspondientes a uno o más parámetros de la corriente de flujo requieren poca o ninguna intervención humana o entrada manual por el usuario. En ciertas modalidades, los métodos incluyen ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en base a las señales de datos correspondientes a uno o más parámetros de la corriente de flujo sin ninguna intervención humana, tal como dos o más parámetros, tal como tres o más parámetros, tal como cuatro o más parámetros e incluyen cinco o más parámetros. En algunas modalidades, los métodos pueden incluir ajustar la presión hidrostática, la presión de fluido de la vaina, carga de las gotas, tensión de desviación, valor de corrección de carga, retardo de las gotas, frecuencia de accionamiento de las gotas, fase de carga de amplitud de las gotas y cualquier combinación de los mismos.

En la práctica de métodos se capturan una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección. Como se discutió anteriormente, los campos de detección pueden variar en dependencia de las propiedades de la corriente de flujo que se interroga. En las modalidades, los métodos pueden incluir capturar en una imagen un campo de detección que abarca 0,001 mm o más de la corriente de flujo, tal como 0,005 mm o más, tal como 0,01 mm o más, tal como 0,05 mm o más, tal como 0,1 mm o más, tal como 0,5 mm o más, tal como 1 mm o más, tal como 2 mm o más, tal como 5 mm o más e incluyen 10 mm o más de la corriente de flujo. El campo de detección interrogado puede variar. En algunas modalidades, el campo de detección incluye el orificio de la boquilla de la célula de flujo. En otras modalidades, el campo de detección incluye la ubicación de la corriente de flujo donde se cargan las gotas que contienen las partículas de interés (es decir, el punto de "ruptura" donde la corriente de flujo continuo comienza a formar gotitas discretas). En otras modalidades, el campo de detección incluye la región donde las partículas cargadas son desviadas por placas deflectoras durante la clasificación de células.

Al capturar una o más imágenes de la corriente de flujo, se ilumina un campo de detección con una fuente de luz. En algunas modalidades, la corriente de flujo se ilumina con una fuente de luz de banda ancha o con una banda de luz estrecha (como se describió anteriormente). El protocolo de fuente de luz de banda ancha adecuado puede incluir, pero no se limita a una lámpara halógena, lámpara de arco de deuterio, lámpara de arco de xenón, fuente de luz de banda ancha acoplada a fibra estabilizada, un LED de banda ancha con espectro continuo, diodo emisor superluminiscente, diodo emisor de luz semiconductor, fuente de luz blanca LED de amplio espectro, una fuente de luz blanca integrada multi-LED, entre otras fuentes de luz de banda ancha o cualquier combinación de las mismas. Las fuentes de luz de banda estrecha adecuadas, incluyen pero no se limitan a un LED de longitud de onda estrecha, un diodo láser o una fuente de luz de banda ancha acoplada a uno o más filtros ópticos de paso de banda, rejillas de difracción, monocromadores o cualquier combinación de los mismos.

En ciertas modalidades, la fuente de luz es una fuente de luz estroboscópica donde la corriente de flujo se ilumina con flash de luz periódicos. Por ejemplo, la frecuencia de la luz estroboscópica puede ser 0,01 kHz o más, tal como 0,05 kHz o más, tal como 0,1 kHz o más, tal como 0,5 kHz o más, tal como 1 kHz o más, tal como 2,5 kHz o más, tal como 5 kHz o más, tal como 10 kHz o más, tal como 25 kHz o más, tal como 50 kHz o más e incluye 100 kHz o más. En algunos casos, la frecuencia de la luz estroboscópica se sincroniza con la frecuencia de accionamiento de las gotitas. En otros casos, la frecuencia de la luz estroboscópica se sincroniza con la captura de imágenes.

Capturar una o más imágenes de la corriente de flujo puede incluir iluminar la corriente de flujo con una combinación de fuentes de luz, tal como con dos o más fuentes de luz, tal como tres o más fuentes de luz, tal como cuatro o más fuentes de luz e incluyen cinco o más fuentes de luz. Cuando se emplea más de una fuente de luz, la corriente de flujo puede iluminarse con las fuentes de luz simultáneamente o secuencialmente, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, cuando se capturan imágenes de la corriente de flujo al iluminar con dos fuentes de luz, los métodos objeto pueden incluir iluminar simultáneamente la corriente de flujo con ambas fuentes de luz. En otras modalidades, capturar imágenes de la corriente de flujo puede incluir iluminar secuencialmente con dos fuentes de luz. Cuando dos fuentes de luz se iluminan secuencialmente, el tiempo que cada fuente de luz ilumina la corriente de flujo puede ser independientemente 0,001 segundos o más, tal como 0,01 segundos o más, tal como 0,1 segundos o más, tal como 1 segundo o más, tal como 5 segundos o más, tal como 10 segundos o más, tal como 30 segundos o más e incluye 60 segundos o más. En modalidades donde se capturan imágenes de la corriente de flujo al iluminar secuencialmente con dos o más fuentes de luz, la duración de la corriente de flujo se ilumina por cada fuente de luz puede ser la misma o diferente.

Las imágenes de la corriente de flujo pueden capturarse continuamente o en intervalos discretos. En algunos casos, los métodos incluyen capturar imágenes continuamente. En otros casos, los métodos incluyen capturar imágenes en intervalos discretos, tal como capturar una imagen de la corriente de flujo cada

0,001 milisegundos, cada 0,01 milisegundos, cada 0,1 milisegundos, cada 1 milisegundo, cada 10 milisegundos, cada 100 milisegundos e incluyen cada 1000 milisegundos, o algún otro intervalo.

Pueden capturarse una o más imágenes en cada campo de detección, tal como 2 o más imágenes de la corriente de flujo en cada campo de detección, tal como 3 o más imágenes, tal como 4 o más imágenes, tal como 5 o más imágenes, tal como 10 o más imágenes, tal como 15 o más imágenes e incluye 25 o más imágenes. Cuando se captura más de una imagen en cada campo de detección, la pluralidad de imágenes puede unirse automáticamente mediante un procesador que tiene un algoritmo de procesamiento de imágenes digitales.

Las imágenes de la corriente de flujo en cada campo de detección pueden capturarse a cualquier distancia adecuada de la corriente de flujo siempre que se capture una imagen usable de la corriente de flujo. Por ejemplo, las imágenes en cada campo de detección pueden capturarse a 0,01 mm o más de la corriente de flujo, tal como 0,05 mm o más, tal como 0,1 mm o más, tal como 0,5 mm o más, tal como 1 mm o más, tal como 2,5 mm o más, tal como 5 mm o más, tal como 10 mm o más, tal como 15 mm o más, tal como 25 mm o más e incluyen 50 mm o más de la corriente de flujo del citómetro de flujo. Las imágenes de la corriente de flujo en cada campo de detección también pueden capturarse en cualquier ángulo de la corriente de flujo. Por ejemplo, las imágenes en cada campo de detección pueden capturarse en un ángulo con respecto al eje de la corriente de flujo que varía de 10° a 90°, tal como de 15° a 85°, tal como de 20° a 80°, tal como de 25° a 75° e incluyen de 30° a 60°. En ciertas modalidades, las imágenes en cada campo de detección pueden capturarse en un ángulo de 90° con respecto al eje de la corriente de flujo.

En algunas modalidades, capturar imágenes de la corriente de flujo incluye mover uno o más sensores de formación de imágenes a lo largo de la trayectoria de la corriente de flujo. Por ejemplo, el sensor de formación de imágenes puede moverse aguas arriba o aguas abajo a lo largo de la corriente de flujo al capturar imágenes en una pluralidad de campos de detección. Por ejemplo, los métodos pueden incluir capturar imágenes de la corriente de flujo en dos o más campos de detección diferentes, tal como 3 o más campos de detección, tal como 4 o más campos de detección e incluyen 5 o más campos de detección. El sensor de formación de imágenes puede moverse continuamente o en intervalos discretos. En algunas modalidades, el sensor de formación de imágenes se mueve continuamente. En otras modalidades, el sensor de formación de imágenes puede moverse a lo largo de la trayectoria de la corriente de flujo en intervalos discretos, tal como por ejemplo en incrementos de 1 mm o más, tal como incrementos de 2 mm o más e incluyen incrementos de 5 mm o más.

Como se resumió anteriormente, los métodos incluyen generar una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo a partir de las imágenes capturadas. En los campos de detección donde la corriente de flujo es continua, los métodos pueden incluir generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo, las dimensiones de la corriente de flujo tal como el ancho de la corriente de flujo, así como también la velocidad de flujo y la turbulencia del flujo en base a las imágenes capturadas. En los campos de detección donde la corriente de flujo se compone de gotitas discretas, los métodos pueden incluir generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo, el tamaño de las gotas que incluye el diámetro y el volumen de las gotas, la frecuencia de accionamiento de las gotas, la amplitud de las gotas así como también uniformidad del tamaño y frecuencia de las gotas. En ciertas modalidades, los métodos incluyen generar una señal de datos correspondiente a la relación del tamaño de la corriente de flujo en comparación con el tamaño esperado de la corriente de flujo en base a las características empíricas del citómetro de flujo y los datos introducidos por el usuario. En otras modalidades, los métodos incluyen evaluar las imágenes capturadas para determinar si una corriente de flujo está presente o ausente en un campo de detección particular. En otras modalidades, los métodos incluyen evaluar las imágenes capturadas de la corriente de flujo para determinar el tamaño del orificio de la boquilla de la célula de flujo.

Los métodos incluyen capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección, determinar la posición espacial de la corriente de flujo en el campo de detección en base a las imágenes capturadas y generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo. Por ejemplo, los métodos pueden incluir capturar imágenes de la corriente de flujo en un campo de detección y mapear la posición espacial de la corriente de flujo en un plano X-Y. En algunos casos, la posición de la corriente de flujo en el plano X-Y se compara con el eje vertical de la boquilla de la célula de flujo para determinar la posición de la corriente de flujo con respecto al eje vertical formado por la boquilla de la célula de flujo. Cuando la posición espacial de la corriente de flujo se determina en más de un campo de detección, la posición espacial de la corriente de flujo puede mapearse en un plano X-Y en cada campo de detección y compararse para ajustar con precisión la posición espacial precisa de la corriente de flujo en el plano X-Y. En base a la posición espacial determinada de la corriente de flujo en el campo de detección, los métodos pueden incluir generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo.

En modalidades de acuerdo con los métodos objeto, uno o más parámetros del citómetro de flujo se ajustan en respuesta a la señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo. La señal de datos se usa para ajustar la posición de una etapa de soporte que tiene recipientes para recoger partículas, tal como durante la clasificación de células. En ciertas modalidades, los métodos incluyen generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo y ajustar automáticamente la posición de una etapa de soporte de manera que los recipientes de recogida en la etapa de soporte se alinean con la trayectoria de la corriente de flujo. Por ejemplo, los métodos pueden incluir mapear la posición de la corriente de flujo en cada campo de detección en un plano X-Y, mapear la posición del recipiente en el plano X-Y y hacer coincidir la posición del recipiente en el plano X-Y con la posición de la corriente de flujo en el plano X-Y para alinear el recipiente de recogida con la corriente de flujo. En algunos casos, los métodos incluyen mapear la posición de la corriente de flujo en dos campos de detección. En estos casos, la posición espacial de la corriente de flujo se mapea en el primer campo de detección en un plano X-Y y la posición espacial de la corriente de flujo se mapea en el segundo campo de detección en el plano X-Y. En base a las posiciones mapeadas de la corriente de flujo en el primer y segundo campos de detección, se genera una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo en el citómetro de flujo.

Se genera una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo y ajusta automáticamente la posición de una etapa de soporte en un plano X-Y para optimizar la recogida de la corriente de flujo. Por ejemplo, optimizar la recogida de las partículas puede incluir reducir el número de partículas no recogidas por los recipientes en la etapa de soporte debido a la desalineación de la corriente de flujo con los recipientes colectores, tal como en 5 % o más en comparación con la recogida de la corriente de flujo en un recipiente en una etapa de soporte no ajustada en respuesta a la señal de datos, tal como en 10 % o más, tal como 15 % o más, tal como 20 % o más, tal como 25 % o más, tal como 35 % o más, tal como 50 % o más, tal como 75 % o más, tal como 90 % o más, tal como 95 % o más e incluye en 99 % o más.

Como se describió anteriormente, las etapas de soporte pueden colocarse en cualquier lugar a lo largo de la corriente de flujo como se desee cuando se recogen partículas de la corriente de flujo. En algunos casos, las partículas se recogen en recipientes en una etapa de soporte colocada aguas abajo de las placas deflectoras donde las gotitas de la corriente de flujo se han separado en base a la carga (por ejemplo, positiva, negativa y neutra). En estos casos, los métodos incluyen capturar imágenes de una corriente de flujo en un campo de detección aguas abajo desde las placas deflectoras y generar una señal de datos correspondiente a las posiciones espaciales de las corrientes de flujo de las partículas positivas, negativas y neutras. En base a las posiciones espaciales determinadas de las corrientes de flujo a partir de las imágenes capturadas, la posición de una etapa de soporte que tiene un recipiente multi-compartimental (o tres recipientes separados) puede ajustarse automáticamente para optimizar la recogida de cada corriente de flujo. Por ejemplo, los métodos pueden incluir ajustar la posición de la etapa de soporte de manera que la recogida de las corrientes de flujo se mejore en 5 % o más en comparación con la recogida de las corrientes de flujo en una etapa de soporte no ajustada en respuesta a la señal de datos, tal como en 10 % o más, tal como 15 % o más, tal como 20 % o más, tal como 25 % o más, tal como 35 % o más, tal como 50 % o más, tal como 75 % o más, tal como 90 % o más, tal como 95 % o más e incluye en 99 % o más.

Los métodos de acuerdo con ciertas modalidades se describen en la combinación de etapas mostradas en la Figura 2. Las etapas de esta invención pueden ocurrir en cualquier orden o en cualquier combinación. Por ejemplo en la Figura 2, una configuración experimental puede incluir la instalación de una boquilla adecuada para la tarea de clasificación deseada. La corriente de flujo puede iniciarse y puede recogerse una imagen de la corriente de flujo por la cámara 1. La abertura de la boquilla puede determinarse a partir de la imagen de la corriente de flujo y puede determinarse y establecerse automáticamente cualquier número de parámetros en base a este valor. El láser puede alinearse automáticamente y aproximadamente de acuerdo con la señal de la primera cámara. A medida que la corriente fluye más allá de la cámara 2, puede capturarse una segunda imagen. Las dos imágenes de la cámara 1 y la cámara 2 pueden proporcionar una ubicación precisa de la corriente de flujo en un plano XY. Puede colocarse un láser automáticamente y precisamente en base a esta información y un recipiente de recogida puede colocarse automáticamente en base a esta información. En algunas modalidades la alineación precisa del láser puede facilitar la alineación del recipiente de recogida.

Como se resumió anteriormente, los métodos de acuerdo con las modalidades de la presente descripción incluyen ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a señales de datos derivadas de imágenes capturadas en uno o más campos de detección de una corriente de flujo del citómetro de flujo. En ciertas modalidades, los métodos incluyen ajustar la presión de fluido de la vaina, tensión de carga de las gotitas, tensión de las placas de desviación, valor de corrección de carga, retardo de las gotas, frecuencia de accionamiento de las gotas, amplitud de las gotas y la fase de carga o una combinación de los mismos.

En algunas modalidades, los métodos incluyen ajustar la presión de fluido de la vaina en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunos casos, la presión de fluido de la vaina puede aumentarse tal como en 0,001 psi o más, tal como 0,005 psi o más, tal como en 0,01 psi o más, tal como en 0,05 psi o más, tal como en 0,1 psi o más, tal como 0,5 psi o más, tal como en 1 psi o más, tal como en 5 psi o más, tal como en 10 psi

o más, tal como en 25 psi o más, tal como en 50 psi o más, tal como en 75 psi o más e incluye aumentar la presión hidrostática en 100 psi o más. En otros casos, la presión de fluido de la vaina se reduce, tal como en 0,001 psi o más, tal como 0,005 psi o más, tal como en 0,01 psi o más, tal como en 0,05 psi o más, tal como en 0,1 psi o más, tal como 0,5 psi o más, tal como en 1 psi o más, tal como en 5 psi o más, tal como en 10 psi o más, tal como en 25 psi o más, tal como en 50 psi o más, tal como en 75 psi o más e incluye reducir la presión hidrostática en 100 psi o más.

En otras modalidades, los métodos incluyen ajustar la tensión de carga de las gotas en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunos casos, la tensión de carga de las gotas aumenta, por ejemplo en 0,01 V o más, tal como 0,05 V o más, tal como 0,1 V o más, tal como en 0,5 V o más, tal como en 1 V o más, tal como en 5 V o más, tal como en 10 V o más, tal como en 15 V o más, tal como en 25 V o más, tal como en 50 V o más e incluye aumentar la tensión de carga de las gotas en 75 V o más. En otros casos, la tensión de carga de las gotas se reduce, tal como en 0,01 V o más, tal como 0,05 V o más, tal como 0,1 V o más, tal como en 0,5 V o más, tal como en 1 V o más, tal como en 5 V o más, tal como en 10 V o más, tal como en 15 V o más, tal como en 25 V o más, tal como en 50 V o más e incluye reducir la tensión de carga de las gotas en 75 V o más.

En otras modalidades, los métodos incluyen ajustar la tensión de las placas de desviación en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunos casos, la tensión de las placas de desviación aumenta, tal como en 5 V o más, tal como en 10 V o más, tal como en 50 V o más, tal como en 100 V o más, tal como en 250 V o más, tal como en 500 V o más, tal como en 1000 V o más e incluye aumentar la tensión de las placas de desviación en 2000 V o más. En otros casos, la tensión de carga de las gotas se reduce, tal como en 5 V o más, tal como en 10 V o más, tal como en 50 V o más, tal como en 100 V o más, tal como en 250 V o más, tal como en 500 V o más, tal como en 1000 V o más e incluye reducir la tensión de las placas de desviación en 2000 V o más.

En otras modalidades, los métodos incluyen ajustar la frecuencia de accionamiento de las gotas en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunos casos, la frecuencia de accionamiento de las gotas aumenta, tal como en 0,01 Hz o más, tal como en 0,05 Hz o más, tal como en 0,1 Hz o más, tal como en 0,25 Hz o más, tal como en 0,5 Hz o más, tal como en 1 Hz o más, tal como en 2,5 Hz o más, tal como en 5 Hz o más, tal como en 10 Hz o más e incluye en 25 Hz o más. En otros casos, la frecuencia de las gotas se reduce, tal como en 0,01 Hz o más, tal como en 0,05 Hz o más, tal como en 0,1 Hz o más, tal como en 0,25 Hz o más, tal como en 0,5 Hz o más, tal como en 1 Hz o más, tal como en 2,5 Hz o más, tal como en 5 Hz o más, tal como en 10 Hz o más e incluye en 25 Hz o más.

En otras modalidades, los métodos incluyen ajustar el retardo de las gotas en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunos casos, el retardo de las gotas aumenta, tal como en 0,01 microsegundos o más, tal como en 0,05 microsegundos o más, tal como en 0,1 microsegundos o más, tal como en 0,3 microsegundos o más, tal como en 0,5 microsegundos o más, tal como en 1 microsegundo o más, tal como en 2,5 microsegundos o más, tal como en 5 microsegundos o más, tal como en 7,5 microsegundos o más e incluye aumentar del retardo de las gotas en 10 microsegundos o más. En otros casos, la frecuencia de las gotas se reduce, tal como en 0,01 microsegundos o más, tal como en 0,05 microsegundos o más, tal como en 0,1 microsegundos o más, tal como en 0,3 microsegundos o más, tal como en 0,5 microsegundos o más, tal como en 1 microsegundo o más, tal como en 2,5 microsegundos o más, tal como en 5 microsegundos o más, tal como en 7,5 microsegundos o más e incluye reducir el retardo de las gotas en 10 microsegundos o más.

En otras modalidades, los métodos incluyen ajustar la amplitud de las gotas en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunos casos, la amplitud de las gotas aumenta, tal como en 0,01 volts o más, tal como en 0,025 volts o más, tal como en 0,05 volts o más, tal como en 0,1 volts o más, tal como en 0,25 volts o más, tal como en 0,5 volts o más e incluye aumentar la amplitud de las gotas en 1 volt o más. En otros casos, la amplitud de las gotas se reduce, tal como en 0,01 volts o más, tal como en 0,025 volts o más, tal como en 0,05 volts o más, tal como en 0,075 volts o más, tal como en 0,1 volts o más, tal como en 0,25 volts o más e incluye reducir la amplitud de las gotas en 1 volt o más.

En algunas modalidades, los métodos incluyen capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección, caracterizar las dimensiones físicas de la corriente de flujo en el campo de detección en base a las imágenes capturadas y generar una señal de datos correspondiente a las dimensiones físicas de la corriente de flujo. En campos de detección donde la corriente de flujo es una corriente continua, los métodos pueden incluir tomar las imágenes capturadas y generar una señal de datos correspondiente al ancho de la corriente de flujo. En los campos de detección donde la corriente de flujo se

compone de gotitas discretas, los métodos pueden incluir tomar las imágenes capturadas y generar señales de datos correspondientes al tamaño de las gotitas, tal como el diámetro de las gotitas.

5 En ciertos casos, los métodos pueden incluir determinar un diámetro del orificio de la boquilla de una célula de flujo en base a las imágenes capturadas. En estos casos, los métodos pueden incluir capturar imágenes de la corriente de flujo en el orificio de la boquilla de la célula de flujo y generar una señal de datos correspondiente a las dimensiones físicas de la corriente de flujo. En base a la señal de datos correspondiente a las dimensiones físicas de la corriente de flujo, se determina el diámetro de abertura de la boquilla de la célula de flujo. En ciertos casos, los métodos incluyen determinar el diámetro de abertura de la boquilla de la célula de flujo mediante el uso del ancho de la corriente de flujo. En otros casos, los métodos incluyen determinar el diámetro de abertura de la boquilla de la célula de flujo mediante el uso del diámetro de las gotitas. En estas modalidades, los métodos pueden incluir además automatizar los ajustes de uno o más parámetros del citómetro de flujo en base al diámetro de abertura de la boquilla de la célula de flujo determinada. Por ejemplo, los métodos pueden incluir ajustar automáticamente la presión de fluido de la vaina, frecuencia de accionamiento de las gotas, carga de las gotas, tensión de desviación, valor de corrección de carga, retardo de carga, frecuencia de carga, fase de carga de amplitud de las gotas o una combinación de los mismos, como se discutió anteriormente.

20 En ciertas modalidades, los métodos pueden incluir automatizar los ajustes a la frecuencia de accionamiento de las gotas en respuesta al diámetro del orificio de la boquilla de la célula de flujo determinado. Por ejemplo, la frecuencia de accionamiento de las gotas puede aumentarse en 0,01 Hz o más, tal como en 0,05 Hz o más, tal como en 0,1 Hz o más, tal como en 0,25 Hz o más, tal como en 0,5 Hz o más, tal como en 1 Hz o más, tal como en 2,5 Hz o más, tal como en 5 Hz o más, tal como en 10 Hz o más e incluye en 25 Hz o más. En otros casos, los métodos incluyen reducir la frecuencia de accionamiento de las gotas en respuesta al diámetro del orificio de la boquilla de la célula de flujo determinado, tal como en 0,01 Hz o más, tal como en 0,05 Hz o más, tal como en 0,1 Hz o más, tal como en 0,25 Hz o más, tal como en 0,5 Hz o más, tal como en 1 Hz o más, tal como en 2,5 Hz o más, tal como en 5 Hz o más, tal como en 10 Hz o más e incluyen en 25 Hz o más.

30 En otras modalidades, los métodos pueden incluir automatizar los ajustes a la presión de fluido de la vaina en respuesta al diámetro del orificio de la boquilla de la célula de flujo determinado. Por ejemplo, la presión de fluido de la vaina puede aumentarse en 0,001 psi o más, tal como en 0,005 psi o más, tal como en 0,01 psi o más, tal como en 0,05 psi o más, tal como en 0,1 psi o más, tal como en 0,5 psi o más, tal como en 1 psi o más, tal como en 5 psi o más, tal como en 10 psi o más, tal como en 25 psi o más, tal como en 50 psi o más, tal como en 75 psi o más e incluye aumentar la presión de fluido de la vaina en 100 psi o más. En otros casos, los métodos incluyen reducir la presión de fluido de la vaina en respuesta al diámetro del orificio de la boquilla de la célula de flujo determinado, tal como en 0,001 psi o más, tal como en 0,005 psi o más, tal como en 0,01 psi o más, tal como en 0,05 psi o más, tal como 0,1 psi o más, tal como en 0,5 psi o más, tal como en 1 psi o más, tal como en 5 psi o más, tal como en 10 psi o más, tal como en 25 psi o más, tal como en 50 psi o más, tal como en 75 psi o más e incluyen reducir la presión de fluido de la vaina en 100 psi o más.

45 En algunas modalidades, los métodos pueden incluir comparar las dimensiones físicas de la corriente de flujo determinadas a partir de las imágenes capturadas con las dimensiones esperadas en base a las características empíricas del citómetro de flujo (tal como el tamaño del orificio de la boquilla de la célula de flujo y la presión de fluido de la vaina) así como también los parámetros introducidos por el usuario. En estos casos, los métodos incluyen generar una señal de datos correspondiente a la relación de las dimensiones físicas de la corriente de flujo determinada a partir de las imágenes capturadas en comparación con las dimensiones de la corriente de flujo esperadas en base a las características empíricas del citómetro de flujo y los parámetros introducidos por el usuario. Por ejemplo, los métodos pueden incluir generar una señal de datos que indica que la corriente de flujo determinada a partir de las imágenes capturadas es 99 % o menos del tamaño esperado de la corriente de flujo, tal como 95 % o menos, tal como 90 % o menos, tal como 85 % o menos, tal como 80 % o menos, tal como 75 % o menos, tal como 50 % o menos, tal como 25 % o menos e incluyen 10 % o menos del tamaño esperado de la corriente de flujo. En otras modalidades, los métodos pueden incluir generar una señal de datos que indica que la corriente de flujo determinada a partir de las imágenes capturadas es más del tamaño esperado, tal como que es 105 % o más del tamaño de la corriente de flujo, tal como un 110 % o más, tal como 125 % o más e incluyen 150 % o más. En estas modalidades, los métodos pueden incluir además automatizar los ajustes de uno o más parámetros del citómetro de flujo en base a la señal de datos generada. Por ejemplo, los métodos pueden incluir ajustar automáticamente la velocidad de bombeo de fluido de la vaina, la presión de fluido de la vaina o la frecuencia de accionamiento de las gotas.

65 Los métodos de interés también pueden incluir capturar imágenes en un campo de detección en el punto de ruptura de la corriente de flujo, generar una señal de datos correspondiente al volumen de las gotas de las gotitas aguas abajo desde el punto de ruptura y ajustar una o más propiedades del citómetro de flujo en respuesta al volumen de las gotas determinado. En algunas modalidades, los métodos incluyen ajustar automáticamente la frecuencia de accionamiento de las gotas de la corriente de flujo en respuesta al volumen

de las gotas determinado. Por ejemplo, los métodos pueden incluir reducir la frecuencia de accionamiento de las gotas, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más, tal como en 90 % o más, tal como en 95 % o más e incluyen en 99 % o más. En otros casos, los métodos pueden incluir aumentar la frecuencia de accionamiento de las gotas en respuesta al volumen de las gotas determinado, tal como en 5 % o más, tal como en 10 % o más, tal como en 15 % o más, tal como en 25 % o más, tal como en 50 % o más, tal como en 75 % o más, tal como en 90 % o más, tal como en 95 % o más e incluyen en 99 % o más.

En otras modalidades, los métodos incluyen regular automáticamente el volumen de recogida de la muestra durante la clasificación de células en base al volumen de las gotas determinado. Por ejemplo, el volumen deseado para cada muestra recogida puede introducirse en un procesador y en base a la señal de datos correspondiente al volumen de las gotas, el citómetro de flujo puede automatizarse para detener la recogida de la muestra después de una cantidad predeterminada de tiempo, tal como al retirar el recipiente de recogida o al interrumpir la corriente de flujo mediante el citómetro de flujo.

En otras modalidades, los métodos pueden incluir capturar imágenes de una corriente de flujo en un campo de detección, determinar la presencia o ausencia de una corriente de flujo en el campo de detección y ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la presencia o ausencia determinada de la corriente de flujo. Como se discutió anteriormente, los métodos objeto para determinar si una corriente de flujo está presente o no presente en las imágenes capturadas del orificio de la boquilla de la célula de flujo pueden usarse para determinar si la célula de flujo tiene una boquilla obstruida. En estas modalidades, las imágenes capturadas por los sensores de formación de imágenes se evalúan y si se detecta una corriente de flujo en las imágenes, se genera una señal de datos que indica la presencia de una corriente de flujo. Por otro lado, si después de evaluar las imágenes capturadas, se determina que la corriente de flujo está ausente en las imágenes capturadas, se genera una señal de datos que indica la ausencia de una corriente de flujo.

Cuando no está presente una corriente de flujo en las imágenes capturadas, en ciertas modalidades, los métodos pueden incluir alertar automáticamente al usuario de que la ausencia de la corriente de flujo es un resultado de un mal funcionamiento del citómetro de flujo, tal como una boquilla obstruida. En estas modalidades, la señal de datos correspondiente a la ausencia de una corriente de flujo se correlaciona con la entrada del usuario sobre si debe esperarse una corriente de flujo. En algunas modalidades, donde un usuario ha configurado el sistema para que tener una configuración de "bucle cerrado", no se espera ningún flujo. En estas modalidades, el citómetro de flujo no alerta al usuario de un mal funcionamiento (por ejemplo, boquilla obstruida) ya que no se espera una corriente de flujo.

La Figura 3 representa un diagrama de flujo que ilustra métodos para ajustar uno o más parámetros de un citómetro de flujo de acuerdo con ciertas modalidades de la presente descripción. Como se resumió anteriormente, los métodos incluyen capturar una o más imágenes en un campo de detección de una corriente de flujo del citómetro de flujo. Las imágenes pueden, en ciertos casos, capturarse en dos o más campos de detección, tales como 3 o más e incluyen 4 o más campos de detección. En algunas modalidades, los métodos incluyen determinar si una corriente de flujo está presente o ausente. Cuando se determina que una corriente de flujo está ausente y se espera una corriente de flujo (tal como durante el uso normal), puede transmitirse una alerta al usuario de un posible mal funcionamiento del instrumento (por ejemplo, boquilla obstruida). En otras modalidades, los métodos incluyen determinar la posición espacial de la corriente de flujo o determinar las dimensiones físicas de la corriente de flujo. En ciertos casos, los métodos incluyen determinar inicialmente que una corriente de flujo está presente en una o más imágenes capturadas, seguido por determinar la posición espacial de la corriente de flujo. En otros casos, los métodos incluyen determinar inicialmente que una corriente de flujo está presente en la una o más imágenes capturadas, seguido por determinar las dimensiones físicas de la corriente de flujo. En algunas modalidades, los métodos incluyen determinar una propiedad física del citómetro de flujo en base a las dimensiones físicas de la corriente de flujo a partir de las imágenes capturadas. Por ejemplo, el orificio de la boquilla de la célula de flujo puede determinarse en base a las dimensiones físicas de la corriente de flujo a partir de las imágenes capturadas.

Los métodos también incluyen ajustar automáticamente uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a las señales de datos derivadas de las imágenes capturadas, tal como ajustar la presión de fluido de la vaina, tensión de carga de las gotitas, tensión de las placas de desviación, valor de corrección de carga, retardo de las gotas, frecuencia de accionamiento de las gotas, amplitud de las gotas y fase de carga o una combinación de los mismos. En ciertas modalidades, el uno o más parámetros incluye ajustar la posición de una o más etapas de soporte, por ejemplo, una etapa de soporte que tiene un recipiente para recoger partículas de la corriente de flujo durante la clasificación de células.

Como se discutió anteriormente, los métodos objeto pueden ser completamente automatizados, de manera que los ajustes se hacen en respuesta a señales de datos correspondientes a uno o más parámetros de la corriente de flujo con poca, si alguna, intervención humana o entrada manual por el usuario.

Sistemas controlados por ordenador

Los aspectos de la presente descripción incluyen además sistemas controlados por ordenador para poner en práctica los métodos objeto, donde los sistemas incluyen además uno o más ordenadores para la automatización completa o automatización parcial de un sistema para poner en práctica los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, los sistemas incluyen un ordenador que tiene un medio de almacenamiento legible por ordenador con un programa informático almacenado en el mismo, donde el programa informático cuando se carga en el ordenador incluye instrucciones para capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección; el algoritmo para determinar la posición espacial de la corriente de flujo en el campo de detección; el algoritmo para generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo; e instrucciones para ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos. En ciertos casos, los sistemas incluyen un ordenador que tiene un medio de almacenamiento legible por ordenador con un programa informático almacenado en el mismo, donde el programa informático cuando se carga en el ordenador incluye instrucciones para capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección; el algoritmo para determinar las dimensiones físicas de la corriente de flujo en el campo de detección; el algoritmo para generar una señal de datos correspondiente a las dimensiones físicas de la corriente de flujo; e instrucciones para ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos.

En modalidades, el sistema incluye un módulo de entrada, un módulo de procesamiento y un módulo de salida. Los módulos de procesamiento de interés pueden incluir uno o más procesadores que se configuran y automatizan para ajustar uno o más parámetros de un citómetro de flujo como se describió anteriormente. Por ejemplo los módulos de procesamiento pueden incluir dos o más procesadores que se configuran y automatizan para ajustar uno o más parámetros de un citómetro de flujo como se describió anteriormente, tal como tres o más procesadores, tal como cuatro o más procesadores e incluyen cinco o más procesadores.

En algunas modalidades, los sistemas objeto pueden incluir un módulo de entrada de manera que los parámetros o información acerca de la muestra fluidica, presión de fluido de la vaina, presión hidrostática, carga de la corriente de flujo, tensión de desviación, valor de corrección de carga, retardo de las gotas, frecuencia de accionamiento de las gotas, amplitud de las gotas y fase de carga, orificio de la boquilla de la célula de flujo, posición de las etapas de soporte, sensores de formación de imágenes, fuentes de luz, protocolos de ajuste óptico, amplificadores así como también propiedades, resolución y sensibilidad de los sensores de formación de imágenes pueden introducirse antes de poner en práctica los métodos objeto.

Como se describió anteriormente, cada procesador incluye una memoria que tiene una pluralidad de instrucciones para realizar las etapas de los métodos objeto, tales como capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección; determinar una o más propiedades de la corriente de flujo en el campo de detección; generar una señal de datos correspondiente a la una o más propiedades de la corriente de flujo; y ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos. Después que el procesador ha realizado una o más de las etapas de los métodos objeto, el procesador puede automatizarse para hacer ajustes en los parámetros del citómetro de flujo, tales como los ajustes como se describió anteriormente.

Los sistemas objeto pueden incluir tanto componentes de hardware como de software, donde los componentes de hardware pueden tomar la forma de una o más plataformas, por ejemplo, en la forma de servidores, de manera que los elementos funcionales, es decir, aquellos elementos del sistema que llevan a cabo tareas específicas (tales como gestionar la entrada y salida de información, procesar información, etc.) del sistema pueden llevarse a cabo mediante la ejecución de aplicaciones de software en y a través de una o más plataformas informáticas representadas del sistema.

Los sistemas pueden incluir una pantalla y un dispositivo de entrada del operador. Los dispositivos de entrada del operador pueden, por ejemplo, ser un teclado, ratón, o similares. El módulo de procesamiento incluye un procesador que tiene acceso a una memoria que tiene instrucciones almacenadas en el mismo para realizar las etapas de los métodos objeto. El módulo de procesamiento puede incluir un sistema operativo, un controlador de interfaz gráfica de usuario (GUI), una memoria del sistema, dispositivos de almacenamiento de memoria, y controladores de entrada-salida, memoria caché, una unidad de respaldo de datos, y muchos otros dispositivos. El procesador puede ser un procesador disponible comercialmente o puede ser uno de otros procesadores que están o estarán disponibles. El procesador ejecuta el sistema operativo y el sistema operativo interactúa con el firmware y el hardware de manera bien conocida, y facilita al procesador en la coordinación y ejecución de las funciones de varios programas informáticos que pueden escribirse en una variedad de lenguajes de programación, tal como Java, Perl, C++, otros lenguajes de alto nivel o bajo nivel, así como también combinaciones de los mismos, como se conoce en la técnica. El sistema operativo, típicamente en cooperación con el procesador, coordina y ejecuta funciones de los otros componentes del ordenador. El sistema operativo también proporciona planificación, control de entrada-salida, gestión de archivos y datos, gestión de memoria, y control de comunicaciones y servicios relacionados, todo de acuerdo con técnicas conocidas.

La memoria del sistema puede ser cualquiera de una variedad de dispositivos de almacenamiento de memoria conocidos o futuros. Los ejemplos incluyen cualquier memoria de acceso aleatorio (RAM) comúnmente disponible, medio magnético tal como un disco duro o cinta residente, un medio óptico tal como un disco compacto de lectura y escritura, dispositivos de memoria flash, u otro dispositivo de almacenamiento de memoria. El dispositivo de almacenamiento de memoria puede ser cualquiera de una variedad de dispositivos conocidos o futuros, que incluyen una unidad de disco compacto, una unidad de cinta, una unidad de disco duro extraíble, o una unidad de disquete. Tales tipos de dispositivos de almacenamiento de memoria típicamente leen desde, y/o escriben en, un medio de almacenamiento de programas (no mostrado) tal como, respectivamente, un disco compacto, cinta magnética, disco duro extraíble, o disquete. Cualquiera de estos medios de almacenamiento de programas, u otros ahora en uso o que puedan desarrollarse posteriormente, pueden considerarse un producto de programa informático. Como se apreciará, estos medios de almacenamiento de programas almacenan típicamente un programa de software informático y/o datos. Los programas de software informáticos, también denominados lógica de control del ordenador, típicamente se almacenan en la memoria del sistema y/o el dispositivo de almacenamiento de programa usado junto con el dispositivo de almacenamiento de memoria.

En algunas modalidades, se describe un producto de programa informático que comprende un medio usable por ordenador que tiene lógica de control (programa de software informático, que incluye el código de programa) almacenada en el mismo. La lógica de control, cuando se ejecuta por el procesador del ordenador, provoca que el procesador realice las funciones descritas en la presente descripción. En otras modalidades, algunas funciones se implementan principalmente en el hardware mediante el uso, por ejemplo, de una máquina de estado de hardware. La implementación de la máquina de estado de hardware para realizar las funciones descritas en la presente descripción será evidente para los expertos en las técnicas relevantes.

La memoria puede ser cualquier dispositivo adecuado en el cual el procesador pueda almacenar y recuperar datos, tales como dispositivos de almacenamiento magnéticos, ópticos, o de estado sólido (que incluyen discos magnéticos u ópticos o cinta o RAM, o cualquier otro dispositivo adecuado, ya sea fijo o portátil). El procesador puede incluir un microprocesador digital de propósito general programado adecuadamente desde un medio legible por ordenador que lleva el código del programa necesario. La programación puede proporcionarse remotamente al procesador a través de un canal de comunicación, o puede guardarse anteriormente en un producto de programa informático tal como la memoria o algún otro medio de almacenamiento legible por ordenador portátil o fijo mediante el uso de cualquiera de aquellos dispositivos en conexión con la memoria. Por ejemplo, un disco magnético u óptico puede llevar a cabo la programación, y puede leerse por un lector/grabador de disco. Los sistemas de la invención también incluyen programación, por ejemplo, en forma de productos de programas informáticos, algoritmos para usar en la práctica de los métodos como se describió anteriormente. La programación de acuerdo con la presente invención puede grabarse en un medio legible por ordenador, por ejemplo, cualquier medio que pueda leerse y accederse directamente por un ordenador. Tales medios incluyen, pero no se limitan a: medios de almacenamiento magnético, tales como disquetes, medio de almacenamiento de disco duro, y cinta magnética; medios de almacenamiento óptico tal como el CD-ROM; medios de almacenamiento eléctrico tal como la RAM y la ROM; unidad flash portátil; e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos.

El procesador también puede tener acceso a un canal de comunicación para comunicarse con un usuario en una ubicación remota. Por ubicación remota se entiende que el usuario no está directamente en contacto con el sistema y transmite información de entrada a un administrador de entrada desde un dispositivo externo, tal como un ordenador conectado a una Red de área amplia ("WAN"), red telefónica, red satelital, o cualquier otro canal de comunicación adecuado, que incluye un teléfono móvil (por ejemplo, un teléfono inteligente).

En algunas modalidades, los sistemas de acuerdo con la presente descripción pueden configurarse para incluir una interfaz de comunicación. En algunas modalidades, la interfaz de comunicación incluye un receptor y/o transmisor para comunicarse con una red y/u otro dispositivo. La interfaz de comunicación puede configurarse para la comunicación cableada o inalámbrica, que incluye, pero no se limita a, la comunicación por radiofrecuencia (RF) (por ejemplo, Identificación por radiofrecuencia (RFID), protocolos de comunicación Zigbee, WiFi, infrarrojo, bus serie universal (USB) inalámbrico, Banda ultraancha (UWB), protocolos de comunicación por Bluetooth®, y comunicación celular, tal como el acceso múltiple por división de código (CDMA) o el Sistema global para comunicaciones móviles (GSM).

En una modalidad, la interfaz de comunicación se configura para incluir uno o más puertos de comunicación, por ejemplo, puertos físicos o interfaces tales como un puerto USB, un puerto RS-232 o cualquier otro puerto de conexión eléctrica adecuado para permitir la comunicación de datos entre los sistemas objeto y otros dispositivos externos tales como un terminal de ordenador (por ejemplo, en el consultorio médico o en un entorno hospitalario) que se configura para una comunicación de datos complementaria similar.

En una modalidad, la interfaz de comunicación se configura para comunicación por infrarrojos, comunicación por Bluetooth®, o cualquier otro protocolo de comunicación inalámbrica adecuado para permitir que los

sistemas objeto se comuniquen con otros dispositivos tales como terminales de ordenador y/o redes, teléfonos móviles habilitados para comunicación, asistentes digitales personales, o cualquier otro dispositivo de comunicación que el usuario puede usar conjuntamente.

5 En una modalidad, la interfaz de comunicación se configura para proporcionar una conexión para la transferencia de datos que utiliza el Protocolo de Internet (IP) a través de una red de teléfono celular, Servicio de mensajes cortos (SMS), conexión inalámbrica a un ordenador personal (PC) en una Red de área local (LAN) que se conecta a Internet, o una conexión WiFi a Internet en un punto de acceso WiFi.

10 En una modalidad, los sistemas objeto se configuran para comunicarse de manera inalámbrica con un dispositivo servidor a través de la interfaz de comunicación, por ejemplo, mediante el uso de un estándar común tal como el protocolo 802.11 o Bluetooth® RF, o un protocolo de infrarrojos IrDA. El dispositivo servidor puede ser otro dispositivo portátil, tal como un teléfono inteligente, asistente personal digital (PDA) u ordenador portátil; o un dispositivo más grande tal como un ordenador de escritorio, un aparato, etc. En algunas modalidades, el dispositivo servidor tiene una pantalla, tal como una pantalla de cristal líquido (LCD), así como también un dispositivo de entrada, tal como botones, un teclado, ratón o pantalla táctil.

En algunas modalidades, la interfaz de comunicación se configura para comunicar automáticamente o semiautomáticamente los datos almacenados en los sistemas objeto, por ejemplo, en una unidad de almacenamiento de datos opcional, con una red o dispositivo servidor mediante el uso de uno o más de los protocolos y/o mecanismos de comunicación descritos anteriormente.

Los controladores de salida pueden incluir controladores para cualquiera de una variedad de dispositivos de visualización conocidos para presentar información a un usuario, ya sea un humano o una máquina, ya sea local o remoto. Si uno de los dispositivos de visualización proporciona información visual, esta información típicamente puede organizarse lógicamente y/o físicamente como una serie de elementos de imagen. Un controlador de interfaz gráfica de usuario (GUI) puede incluir cualquiera de una variedad de programas de software conocidos o futuros para proporcionar interfaces gráficas de entrada y salida entre el sistema y un usuario, y para procesar las entradas del usuario. Los elementos funcionales del ordenador pueden comunicarse entre sí a través del bus del sistema. Algunas de estas comunicaciones pueden lograrse en modalidades alternativas mediante el uso de la red u otros tipos de comunicaciones remotas. El administrador de salida también puede proporcionar información generada por el módulo de procesamiento a un usuario en una ubicación remota, por ejemplo, a través de Internet, teléfono o red satelital, de acuerdo con técnicas conocidas. La presentación de datos por el administrador de salida puede implementarse de acuerdo con una variedad de técnicas conocidas. Como algunos ejemplos, los datos pueden incluir documentos SQL, HTML o XML, correo electrónico u otros archivos, o datos en otras formas. Los datos pueden incluir direcciones URL de Internet de manera que un usuario pueda recuperar SQL, HTML, XML u otros documentos o datos adicionales desde fuentes remotas. La una o más plataformas presentes en los sistemas objeto pueden ser cualquier tipo de plataforma informática conocida o un tipo a desarrollar en el futuro, aunque típicamente serán de una clase de ordenador comúnmente referida como servidores. Sin embargo, también pueden ser un ordenador principal, una estación de trabajo, u otro tipo de ordenador. Pueden conectarse a través de cualquier tipo de cableado conocido o futuro u otro sistema de comunicación que incluyen sistemas inalámbricos, ya sea en red o lo contrario. Pueden reubicarse o pueden separarse físicamente. Pueden emplearse varios sistemas operativos en cualquiera de las plataformas informáticas, posiblemente en dependencia del tipo y/o marca de la plataforma informática elegida. Los sistemas operativos adecuados incluyen Windows NT®, Windows XP, Windows 7, Windows 8, iOS, Sun Solaris, Linux, OS/400, Compaq Tru64 Unix, SGI IRIX, Siemens Reliant Unix, y otros.

Utilidad

50 Los sistemas, métodos y sistemas informáticos objeto encuentran uso en una variedad de aplicaciones diferentes donde es deseable automatizar los ajustes a uno o más parámetros de un citómetro de flujo para proporcionar sistemas rápidos, confiables para caracterizar y clasificar las células a partir de una muestra biológica. Las modalidades de la presente descripción encuentran su uso cuando se desea minimizar el grado de dependencia de la intervención humana y los ajustes al sistema, tal como en la investigación y en las pruebas de laboratorio de alto rendimiento. La presente descripción también encuentra su uso cuando es deseable proporcionar un citómetro de flujo con precisión de clasificación de células mejorada, recogida de partículas mejorada, sistemas que proporcionan alertas sobre el mal funcionamiento de componentes (por ejemplo, boquilla de la célula de flujo obstruida), consumo de energía reducido, eficiencia de carga de partículas, carga de partículas más precisa y desviación de partículas mejorada durante la clasificación de células. En modalidades, la presente descripción reduce la necesidad de entrada del usuario o ajuste manual durante el análisis de la muestra con un citómetro de flujo. En ciertas modalidades, los sistemas objeto proporcionan protocolos completamente automatizados de manera que los ajustes a un citómetro de flujo durante el uso requieren poca, si lo hubiera intervención humana.

65

La presente descripción también encuentra uso en aplicaciones donde pueden desearse células preparadas a partir de una muestra biológica para investigación, pruebas de laboratorio o para uso en terapia. En algunas modalidades, los métodos y dispositivos objeto pueden facilitar la obtención de células individuales preparadas a partir de una muestra biológica fluidica o de tejido objeto. Por ejemplo, los métodos y sistemas objeto facilitan obtener células a partir de las muestras fluidicas o de tejido para su uso como un espécimen de investigación o diagnóstico para enfermedades tales como un cáncer. Del mismo modo, los métodos y sistemas objeto facilitan obtener células a partir de las muestras fluidicas o de tejido para su uso en terapia. Los métodos y dispositivos de la presente descripción permiten separar y recoger células a partir de una muestra biológica (por ejemplo, órgano, tejido, fragmento de tejido, fluido) con mayor eficiencia y bajo costo en comparación con sistemas de citometría de flujo tradicional.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, es fácilmente evidente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta descripción que ciertos cambios y modificaciones pueden hacerse al mismo sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

En consecuencia, lo anterior solamente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la técnica podrán ser capaces de elaborar varias disposiciones las cuales, aunque no se describen o muestran explícitamente en la presente descripción, incorporan los principios de la invención y se incluyen dentro de su alcance. Además, todos los ejemplos y el lenguaje condicional expuesto en la presente descripción pretenden principalmente ayudar al lector en la comprensión de los principios de la invención sin limitarse a tales ejemplos y condiciones expuestos específicamente. Además, todas las declaraciones en la presente descripción que exponen principios, aspectos, y modalidades de la invención así como también ejemplos específicos de la misma, pretenden incluir equivalentes tanto estructurales como funcionales de la misma. Adicionalmente, se pretende que tales equivalentes incluyan tanto los equivalentes conocidos actualmente como los equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualquier elemento desarrollado que realice la misma función, independientemente de la estructura. El alcance de la presente invención, por lo tanto, no pretende limitarse a las modalidades ilustrativas mostradas y descritas en la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un citómetro de flujo (100) que comprende:

5 un primer sensor de formación de imágenes (113) configurado para capturar una o más imágenes de una corriente de flujo (111) en un primer campo de detección del citómetro de flujo (100); y un procesador que comprende una memoria acoplada operativamente al procesador, en donde la memoria incluye instrucciones almacenadas en el mismo para determinar una o más propiedades de la corriente de flujo y generar una señal de datos correspondiente a la una o más propiedades de la corriente de flujo,
10 en donde el procesador se configura para ajustar automáticamente uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos, y en donde el procesador se configura para:

15 determinar la posición espacial de la corriente de flujo y generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo,

caracterizado porque la determinación se basa en datos obtenidos de un sistema que además comprende:

20 un segundo sensor de formación de imágenes (120) configurado para detectar la posición de la corriente de flujo en un segundo campo de detección que se orienta sustancialmente de manera ortogonal en un plano X-Y ortogonal al eje de la corriente de flujo desde el primer campo de detección y para generar una segunda señal representativa de la posición de la corriente en el segundo campo de detección;

25 una primera etapa de soporte (116) que comprende un láser (117) para proporcionar iluminación y acoplado operativamente al primer y segundo sensores de formación de imágenes, en donde la primera etapa se configura para ajustar automáticamente las posiciones en el plano X-Y en respuesta a la segunda señal en adición de una primera señal que es representativa de la posición de la corriente en el primer campo de detección del primer sensor de formación de imágenes; y

30 una segunda etapa de soporte (119) que comprende un recipiente de recogida (118) y configurada para ajustar posiciones en el plano X-Y en respuesta a la primera señal.

35 2. El citómetro de flujo (100) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el citómetro de flujo se configura para alinear automáticamente la segunda etapa de soporte (119) con la posición espacial determinada de la corriente de flujo (111).

40 3. El citómetro de flujo (100) de acuerdo con la reivindicación 2, en donde alinear automáticamente el recipiente (118) con la corriente de flujo (111) comprende:

45 mapear la posición de la corriente de flujo en el primer campo de detección en un plano X-Y; mapear la posición del recipiente en el plano X-Y; y hacer coincidir la posición del recipiente con la posición de la corriente de flujo en el plano X-Y.

4. Un método para ajustar uno o más parámetros de un citómetro de flujo (100), el método que comprende:

50 capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo (111) en un campo de detección; determinar una o más propiedades de la corriente de flujo en el campo de detección; generar una señal de datos correspondiente a la una o más propiedades de la corriente de flujo; y ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos, en donde el método comprende:

55 determinar la posición espacial de la corriente de flujo en el campo de detección y generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo .

60 caracterizado porque la determinación se basa en datos obtenidos de un sistema que comprende:

65 un primer sensor de formación de imágenes (113) configurado para detectar una posición de la corriente de flujo en un primer campo de detección y generar una primera señal representativa de la posición de la corriente en el primer campo de detección; un segundo sensor de formación de imágenes (120) configurado para detectar la posición de la corriente de flujo en un segundo campo de detección que se orienta sustancialmente de manera ortogonal en un plano X-Y ortogonal al eje de la corriente de flujo desde el

- 5
10
15
20
25
- primer campo de detección y para generar una segunda señal representativa de la posición de la corriente en el segundo campo de detección;
una primera etapa de soporte (116) que comprende un láser (117) para proporcionar iluminación y acoplado operativamente al primer y segundo sensores de formación de imágenes, en donde la primera etapa se configura para ajustar automáticamente las posiciones en el plano X-Y en respuesta a la segunda señal en adición de la primera señal;
y
una segunda etapa de soporte (119) que comprende un recipiente de recogida (118) y configurada para ajustar posiciones en el plano X-Y en respuesta a la primera señal.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el método comprende además alinear automáticamente la segunda etapa de soporte (119) en base a la posición espacial determinada de la corriente de flujo (111).
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde alinear la segunda etapa de soporte (119) con la posición espacial de la corriente de flujo (111) comprende:
mapear la posición de la corriente de flujo en el primer campo de detección en un plano X-Y;
mapear la posición del recipiente en el plano X-Y; y
hacer coincidir la posición del recipiente con la posición de la corriente de flujo en el plano X-Y.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, que comprende además la etapa de inyectar la muestra en el puerto de muestra del citómetro de flujo (100), en donde el citómetro de flujo comprende un sistema que comprende un procesador con una memoria acoplada operativamente al procesador en donde el sistema se automatiza para realizar las etapas del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6.

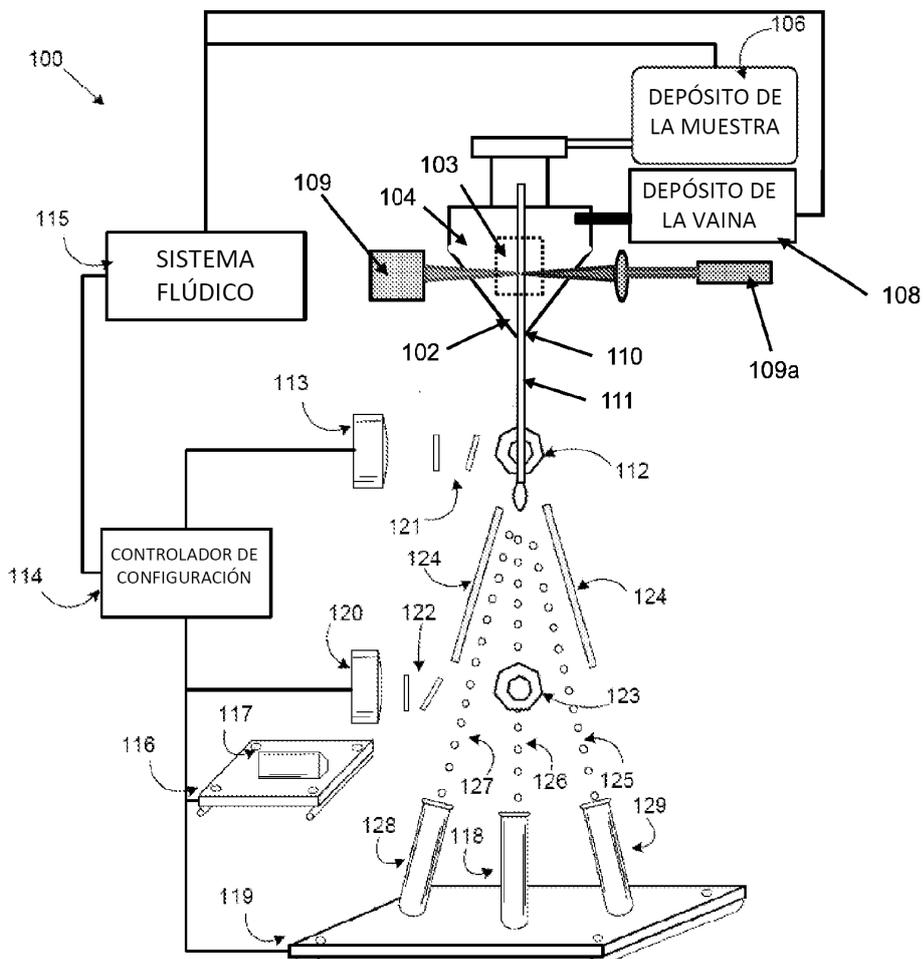


Figura 1

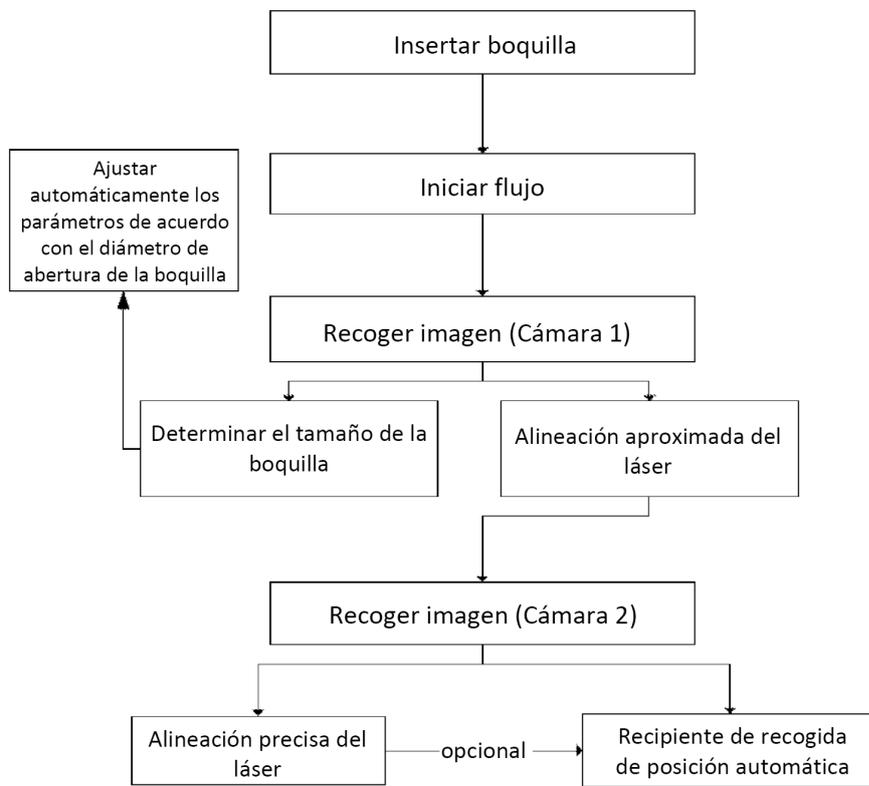


Figura 2

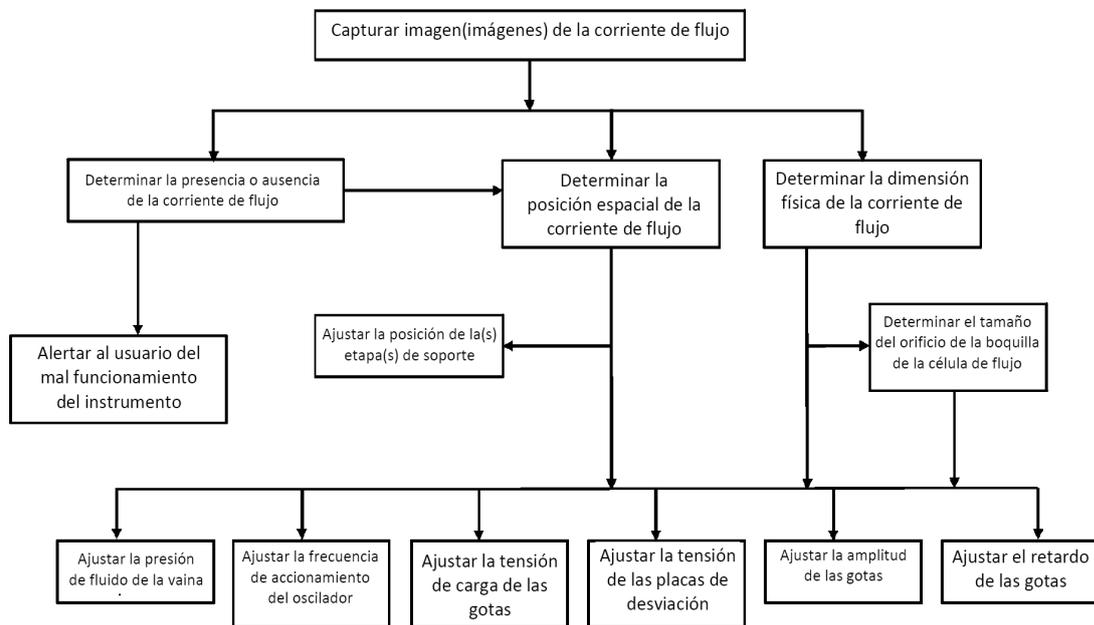


Figura 3