

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 218**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2006 E 15203254 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3045545**

54 Título: **Método y aparato de caracterización y recuento de partículas, en particular de partículas biológicas**

30 Prioridad:

26.10.2005 IT BO20050646

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

16.04.2020

73 Titular/es:

**MENARINI SILICON BIOSYSTEMS S.P.A. (100.0%)
Via G. di Vittorio, 21 B/3
40013 Castel Maggiore (BO), IT**

72 Inventor/es:

**MANARESI, NICOLÒ;
GUERRIERI, ROBERTO y
MEDORO, GIANNI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 754 218 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

Método y aparato de caracterización y recuento de partículas, en particular de partículas biológicas

Campo técnico

5 La presente invención se relaciona con un aparato para la caracterización y/o el recuento de partículas. La invención encuentra principalmente su aplicación en la implementación de protocolos biológicos sobre células individuales.

Estado del arte

10 La solicitud de patente PCT/WO 00/69565 de G. Medoro describe un aparato y un método para la manipulación y la detección de partículas a través del uso de jaulas cerradas de potencial dielectroforético. El método que se describe enseña cómo controlar la posición de cada partícula independientemente de todas las otras dentro de un espacio de dos dimensiones. La fuerza que se usa para atrapar las partículas en suspensión es de dielectroforesis negativa. El control individual sobre las operaciones de manipulación se lleva a cabo a través de la programación de elementos de memoria y circuitos asociados a cada elemento de una serie de electrodos y sensores que se integran dentro del mismo sustrato. Sin embargo, el "ruido" espacial fijo ligado a la dispersión de las características de los sensores (que se conocen técnicamente como "Ruido de Patrón Fijo") limita severamente la confiabilidad de los mismos sensores en las células de detección. La patente informa del uso de sensores ópticos y/o de impedancia. Incluso al sustraer una imagen de referencia para la compensación de las variaciones en la ganancia de los sensores, el resultado no es completamente confiable debido a otros factores que no se compensan, tales como por ejemplo las variaciones espaciales de la iluminación (para los sensores ópticos) o de la conductividad del líquido (para los sensores de impedancia).

20 La patente US 6,294,063, de Becker et al., divulga un método y un aparato para la manipulación de material biológico gaseoso líquido o sólido a través de una distribución de fuerzas programables. La patente menciona también el uso de sensores. Pero en este caso también, existe el problema del Ruido de Patrón Fijo.

25 Otro método que se conoce para la manipulación de partículas líquidas (gotas) es la Electrohumectación sobre Dieléctrico (EWOD), que se describe T.B. Jones, Journal of Micromechanics and Microengineering, 15 (2005) 1184-1187. En este caso, un campo eléctrico ejercido por electrodos que se suministran a un sustrato permite la propulsión de una gota que se rodea mediante una fase gaseosa en una dirección controlada por la secuencia de electrodos energizados. Se pueden hacer dispositivos con bases en este principio al incluir una tapa (la misma cubierta también con un dieléctrico) como se enseñó mediante la solicitud de la patente US 2004/0058450A1 de Pamula et al., o simplemente también un cable, llamado "cadena", el cual establece el contacto eléctrico con las gotas encima del sustrato. J. Berthier et al., NSTI Nanotech 2005, vol. 1, 2005.

30 Una fuerza adicional para la manipulación de partículas es la fuerza de fricción viscosa que se genera a través del flujo electrohidrodinámico (EHD) tales como los flujos electrotérmicos (ETF) o la electroósmosis AC. En NG. Green, A. Ramos y H. Morgan, J. Phys. D: Appl. Phys. 33 (2000), se usan las FEH para las partículas que se visualizan. Por ejemplo, PCT WO 2004/071668 A1 describe un aparato para la concentración de partículas en algunos electrodos, al aprovechar los flujos electrohidrodinámicos mencionados.

35 En "Impedance Spectroscopy Flow Cytometry: On-Chip Label-Free Cell Differentiation", Cytometry Part A 65A: 124-132 (2005), Cheung K, Gawad S, Renuad P, se usa un sensor diferencial de impedancia integrado en un microchip para diferenciación de partículas en un flujo.

40 En "Near-Field Optical Sensors for Particle Shape Measurements", IEEE Sensor Journal, vol. 3, No. 5, Oct. 2003, pp. 646-651, se describe un chip para la detección de la forma de la partícula con base en una serie de sensores integrados (fotodiodos). Sin embargo, un líquido de flujo opera el movimiento de las partículas, lo que requiere por ejemplo una bomba u otro mecanismo análogo y es imposible de este modo controlar exactamente la posición de las partículas que se van a analizar.

45 En la solicitud de patente italiana BO2005A000481 de Medoro et al., se informan algunos métodos para la manipulación de partículas con conjuntos de electrodo y algunos métodos y aparatos para su detección, los que, sin embargo, tienen limitaciones similares a la patente PCT/WO 00/69565 que ya se mencionó, como la habilidad de diferenciar células diferentes.

50 Finalmente, en la solicitud de patente Internacional No. PCT/IT02/00524, se describe un método en donde se reconocen primeras entidades biológicas a través de segundas entidades biológicas que tienen la capacidad de vincular la primera (o viceversa), donde las primeras entidades biológicas se inmovilizan sobre una superficie que se define a través de una matriz de primeros electrodos al menos activables y dirigibles de manera parcial y selectiva, que se disponen de cara a al menos un segundo electrodo y se encuentran en contacto con las segundas entidades biológicas que se desplazan a través de jaulas de dielectroforesis; la interacción de adhesión, si la hubiera, se detecta entre al menos una parte de la primera y segunda entidades biológicas al excitar grupos fluoróforos enlazados a las segundas entidades biológicas con radiaciones a una primera frecuencia y al detectar la emisión de fluorescencia a una segunda frecuencia a través de sensores ópticos integrados dentro de los electrodos por lo tanto

se presenta nuevamente el problema de eliminar el ruido que se conecta a la detección óptica ("Ruido de Patrón Fijo").

Resumen de la invención

5 El objetivo de la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas es el de proporcionar un aparato para llevar a cabo la caracterización y/o el recuento de partículas de cualquier tipo, el cual, está libre de los inconvenientes que se describen y que permite, en particular, una manipulación precisa de las partículas a obtener, lo cual es al mismo tiempo sustancialmente insensible al inconveniente del Ruido de Patrón Fijo.

10 Es particularmente un objetivo de la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas actuar sobre el control de la posición de cada partícula presente en la muestra, con el fin de desplazar dichas partículas de una manera determinista o estadística, para detectar su presencia y/o caracterizar su tipo con sensores ópticos integrados y/o medidores de impedancia.

15 Aquí y en lo sucesivo, se entienden por los términos "partículas" o "partícula" entidades naturales o artificiales, micrométricas o nanométricas, tales como células, componentes subcelulares, virus, liposomas, niosomas, microbolas (microesferas) y nanobolas, o entidades más pequeñas, tales como, moléculas, proteínas, ADN, ARN, etc., así como gotas de un fluido inmisible en un medio de suspensión, por ejemplo aceite en agua o agua en aceite, o también gotas de líquido en un gas (tal como agua en aire) o, todavía, burbujas de gas en un líquido (tal como aire en agua).

A veces, se usará el término célula, pero si no se especifica de otro modo, se debe pensar como un ejemplo no limitante del uso para la detección y caracterización de partículas en el sentido más amplio descrito anteriormente.

20 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un aparato para la caracterización y/o el recuento de partículas, según se ha especificado anteriormente, de acuerdo con la reivindicación 1.

25 En particular, se utilizan campos de fuerza no uniformes, variables en el tiempo y sensores ópticos integrados. Los campos de fuerza pueden ser de dielectroforesis positiva o negativa, electroforesis o movimientos electrohidrodinámicos, caracterizados por una serie de puntos de equilibrio estable para las partículas (sólido, líquido o gaseoso); el mismo método se adapta a la manipulación de gotas (partículas líquidas) mediante el aprovechamiento de efectos conocidos por la comunidad científica internacional con el nombre de Electrohumectación sobre Dieléctrico.

De este modo, las restricciones de la técnica conocida son superadas por la presente invención.

30 El aparato de acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas es insensible a las variaciones espaciales de la iluminación y al Ruido de Patrón Fijo. Además, es posible caracterizar y clasificar con precisión las partículas manipuladas en el aparato sin necesidad de bombas o flujos de líquido generados de otro modo, lo que provoca un posicionamiento de las partículas analizadas no bien determinado.

35 Finalmente, al contrario de las metodologías que hacen uso de flujos para mover las partículas, al usar un campo de fuerza controlado para mover las partículas, con respecto al sensor, se obtiene una mayor cantidad de información, que consiste por ejemplo en la velocidad de movimiento de la partícula en respuesta al campo de fuerza. Por lo tanto, se obtiene una fuente de información adicional sobre las características de la partícula. Esta información se puede utilizar ventajosamente para diferenciar los diferentes tipos de partículas.

40 Características y ventajas adicionales de la invención tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas serán evidentes a partir de la siguiente descripción de algunas realizaciones no limitantes de la misma, que se lleva a cabo con referencia a las figuras de los dibujos adjuntos.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra el principio de generación de los campos de fuerza a través de conjuntos de electrodos

La Fig. 2 muestra las formas de onda que se relacionan con el método de detección y caracterización con base en un desplazamiento de jaula de las figuras 4 y 9.

45 La Fig. 3 muestra imágenes microscópicas de (a) una bola de poliestireno, (b) una célula K 562, (c) un glóbulo rojo.

La Fig. 4 muestra una secuencia de pasos para la detección/caracterización de partículas con dimensiones inferiores al electrodo.

50 La Fig.5 muestra un diagrama de un curso temporal típico del valor de grises que se detectan en el paso de una célula o bolas con dimensiones del orden de 15-20 μm , y la indicación de algunos posibles parámetros discriminantes.

La Fig. 6 muestra la evolución temporal del valor de grises detectado en el paso de una célula K562 después del

desplazamiento de su jaula.

La figura 7 muestra un diagrama de un transcurso temporal típico del valor de grises detectado en el paso de una pequeña célula o microbola, y la indicación de algunos posibles parámetros discriminantes.

5 La Fig. 8 muestra la evolución temporal del valor de gris detectado en el paso de una bola de poliestireno de 10 μm , 6 μm y 3 μm , respectivamente, tras el desplazamiento de su jaula.

La Fig. 9 muestra una secuencia de etapas útiles para la detección/caracterización de partículas con dimensiones superiores a un electrodo, pero inferiores a dos electrodos.

La Fig. 10 muestra una secuencia elemental de etapas útiles para la detección simultánea de todas las partículas a través del movimiento de todas las jaulas.

10 La Fig. 11 muestra tres imágenes que se pueden adquirir a través de la implementación de la secuencia de pasos de la Fig. 10.

La Fig. 12 muestra una secuencia elemental de pasos que se muestran para la detección simultánea de todas las partículas sin la necesidad de mover las jaulas.

15 La Fig. 13 muestra las formas de onda relacionadas con el método de detección y caracterización con base en la activación y desactivación de jaula de la Fig. 12.

La Fig. 14 muestra otra secuencia de pasos útiles para la detección/caracterización de partículas en una jaula.

La Fig. 15 muestra la arquitectura de un aparato para la investigación de alta resolución de las características de las partículas.

20 La Fig. 16 muestra la arquitectura de un aparato para la determinación en tiempo real del desplazamiento de las partículas tanto en la dirección vertical como horizontal.

La Fig. 17 muestra algunos modos diferentes de iluminación y detección óptica.

La Fig. 18 muestra la vista superior y la vista en sección de un aparato especial para promover la detección de células fluorescentes, con un filtro de emisión integrado en la superficie del chip.

25 La Fig. 19 muestra la vista superior y la vista en sección de un aparato especial para promover la detección de células fluorescentes, con un filtro de emisión integrado en las capas internas del chip.

La Fig. 20 muestra la vista superior y la vista en sección de un aparato especial para promover la detección de células fluorescentes, con filtros de emisión múltiple integrados en la superficie del chip.

La Fig. 21 muestra una representación geométrica del recuento de diferentes tipos de partículas, particularmente de tres tipos diferentes.

30 Descripción detallada

El objetivo de la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas es el de proporcionar un aparato para llevar a cabo la manipulación y/o la detección de partículas.

35 El método y el dispositivo de los implementos de la divulgación se basa en el uso de un campo de fuerza no uniforme (F) a través del cual se atraen partículas individuales o grupos de partículas (BEADS) hacia posiciones de equilibrio estable (CAGE) (figura 1). Tal campo puede ser, por ejemplo, un campo de dielectroforesis (DEP) negativo (NDEP) o positivo (PDEP), un campo de electroforesis (EF) o un campo de movimientos electrohidrodinámicos (EHD) o todavía electrohumectación sobre dieléctrico (EWD).

La detección se puede referir a uno de los siguientes aspectos, o combinaciones de los mismos:

1. el recuento de partículas individuales o la cuantificación;
- 40 2. la identificación y/o caracterización;
3. La localización.

En este sentido, se aprovecha principalmente la medición de la variación de impedancia y/o la medición de la variación de intensidad luminosa que se transmite, difunde o emite en fluorescencia.

Generación de las fuerzas

Existen diferentes métodos para la generación de fuerzas hacia partículas en movimiento, de acuerdo con la técnica conocida (figura 1), a través de matrices de electrodos (EL), que se proporcionan sobre un sustrato. Típicamente, se utiliza una tapa (LID), que puede ser a su vez un electrodo, que delimita una microcámara dentro de la cual las partículas (BEADS) se encuentran típicamente en una suspensión líquida. En la Figura 1 se presentan algunos diagramas de las diferentes fuerzas. En el caso de la dielectroforesis (DEP), las tensiones aplicadas son en voltajes periódicos de fase (V_{phip}) que se muestran con el símbolo de adición (+) y las tensiones periódicas de contrafase (V_{phin}) que se muestran con el símbolo de sustracción (-). Por voltajes de contrafase, se entienden voltajes fuera de fase de 180 grados. El campo genera una fuerza que actúa sobre las partículas, que se atraen hacia los puntos de equilibrio (CAGE). En caso de DEP negativo (NDEP), es posible generar jaulas de fuerza cerradas, de acuerdo con la técnica conocida, si la tapa (LID) es un electrodo conductor; en este caso, se proporciona el punto de equilibrio (CAGE) en correspondencia con cada electrodo conectado con V_{phin} (-) si los electrodos adyacentes están conectados con la fase opuesta V_{phip} (+) y si la tapa (LID) está conectada con la fase V_{phin} (-). Este punto de equilibrio (CAGE) se separa normalmente en el líquido con respecto a los electrodos, por lo que las partículas (BEAD) se encuentran, en estado estacionario, en levitación. En el caso de DEP positivo (PDEP), el punto de equilibrio (CAGE) se encuentra normalmente en correspondencia con la superficie sobre la cual se proporcionan los electrodos, y las partículas (BEADS) se encuentran, en estado estacionario, en contacto con el mismo. Para el PDEP, la presencia de otros electrodos en la cubierta no es necesaria, porque los puntos de equilibrio del PDEP corresponden a los máximos del campo eléctrico. Se puede utilizar una serie de electrodos para la electroforesis, con el fin de atraer partículas cargadas hacia los electrodos con una polaridad opuesta. Para los movimientos electrohidrodinámicos (EHD), las configuraciones de los electrodos generan algunos flujos que impulsan a las partículas hacia puntos de flujo mínimo. Para el EWOD se utiliza generalmente una tapa (LID) que contiene un electrodo recubierto dieléctricamente y la matriz de electrodos se energiza mediante señales de contrafase con respecto a la cubierta en los puntos en los que las partículas (típicamente gotas líquidas en el aire) tienen que ser atraídas. Los electrodos sobre los que la partícula no debe estar presente, por el contrario, se dejan flotantes. Para el EWOD, mediante la manipulación de gotas en el aire, por encima de la serie de electrodos, se puede usar una serie de alambres alternativamente a la cubierta.

A continuación, por razones de facilidad, el uso de jaula cerradas de dielectroforesis negativas como fuerza de ejecución para la descripción de los métodos y aparatos de la divulgación se considera meramente a modo de ejemplo no limitante para los propósitos de la presente divulgación (por esta razón, debe usarse una tapa que actúa como electrodo). Para los expertos en la técnica con capacidades ordinarias, es evidente cómo generalizar los métodos y el aparato descritos a continuación para el uso de diferentes fuerzas de ejecución y diferentes tipos de partículas.

Sensores empleados

Siempre por simplicidad, en lo que sigue sólo se hará referencia al caso de los sensores ópticos, que permiten detectar la potencia óptica incidente sobre un fotodiodo integrado con los electrodos. Para los expertos en la técnica con capacidades ordinarias, es evidente cómo generalizar, en los diferentes casos, los métodos y aparatos descritos a continuación también para el uso alternativo o combinado de sensores integrados de medidores de impedancia.

A continuación, por simplicidad, el término "nivel de gris" también se utilizará como sinónimo de "salida de la señal del sensor integrado". Esta señal, a su vez, podría ser proporcional a la "potencia óptica incidente" (en un sensor óptico, tal como un fotodiodo) o a la impedancia medida (en el caso de sensores integrados del medidor de impedancia).

Métodos para el uso de sensores ópticos

En el caso de los sensores ópticos, generalmente se hará referencia al caso de la iluminación de campo claro (o BF). En este caso, la iluminación impacta el sensor. También son posibles métodos de iluminación de campo oscuro (o DF), o con base en fluorescencia y caen dentro del objeto de la presente divulgación, pero por facilidad no se enumerarán para todos los métodos tratados a continuación, sino que sólo se discuten aquí.

En la figura 17, se muestran algunos métodos para el uso de los sensores ópticos. La figura se refiere a la sección de un aparato con sensores ópticos (PIXEL) integrado en un sustrato (SUB). El dieléctrico entre los sensores y las diferentes capas de metalización que proporcionan los electrodos (EL) puede consistir simplemente en una capa de óxido (OX) o también incluir una capa de filtro (DFL), por ejemplo que se realiza con la tecnología de espejos dicróicos de película delgada.

En el diagrama de detección de campo claro (Fig. 17-BF), la iluminación (LIGHT) procede de la tapa (LID) y la potencia óptica detectada por los sensores varía sustancialmente en función de la distorsión y absorción causada por la partícula (BEAD).

En el diagrama de detección de campo oscuro (Fig. 17-DF), la iluminación (LIGHT) pasa a través de la tapa (LID) con un ángulo de incidencia tal que no llega directamente a los sensores (PIXEL) y la potencia óptica detectada por los sensores varía sustancialmente en función de la radiación difusa (LEVE) de la partícula (BEAD) alcanzada por la iluminación de manera directa (LUZ), o, en caso tal, después de una reflexión sobre los electrodos (RLIGHT).

En el diagrama de detección de fluorescencia de campo claro (Figura 17-BFF), la excitación (EXLIGHT) proviene de la tapa (LID) y la potencia óptica detectada por los sensores varía sustancialmente en función de la fluorescencia emitida (EMLIGHT) por la partícula (BEAD). En este caso, para que la señal de luz emitida (EMLIGHT) no sea superada por la potencia de excitación (EXLIGHT), es aconsejable utilizar uno o más de los siguientes trucos:

- 5 - usar una capa de filtro (DFL) para la longitud de onda de la radiación emitida para la excitación;
- usar una frecuencia de excitación para la cual el sensor óptico (PIXEL) tiene un rendimiento cuántico bajo (es decir, es relativamente insensible a esa longitud de onda). Esto es posible, por ejemplo, utilizando juntas p-n a una profundidad relativamente alta, y una radiación de excitación con una longitud de onda preferiblemente en el UV, en particular mejor si es inferior a 380 nm.

- 10 En el diagrama de la detección de fluorescencia de campo oscuro (figura 17-DFF), la excitación (EXLIGHT) proviene de la tapa (LID) con un ángulo de incidencia tal que no llega directamente a los sensores (PIXEL) La potencia óptica detectada por los sensores varía sustancialmente en función de la fluorescencia emitida por la partícula (BEAD) impactada por la luz de forma directa (EXLIGHT), o, en caso, después de una reflexión sobre los electrodos (RLIGHT). Con el fin de que la luz emitida (EMLIGHT) no sea degradada por la potencia de la luz difundida por la partícula (SLIGHT), se desea, sin embargo usar uno o más de los trucos mencionados anteriormente en el caso de fluorescencia de campo claro, con el objeto de mejorar la selectividad del sistema.

Método para la detección de jaulas completas mediante activación y desactivación de las jaulas

- 20 La figura 12 muestra una posible secuencia de etapas de un método implementado por el dispositivo de acuerdo con la presente divulgación, con el fin de detectar cuáles jaulas están llenas (al menos una partícula está encerrada) y cuáles están vacías, sin la necesidad de desplazar las propias jaulas. Este método es particularmente adecuado cuando el patrón aplicado a los electrodos es tan grueso como para no permitir el desplazamiento de las jaulas. Además, puede ser ventajoso que si el aparato no presenta circuitos para el desplazamiento de las jaulas.

- 25 El método se basa en la alternancia de fases de ejecución, para el atrapamiento/liberación de las partículas (BEAD) en las jaulas (CAGE) y detección, durante el cual una o más imágenes son adquiridas por los sensores integrados (PIXEL).

Las formas de onda se esquematizan en la Figura 13.

- 30 En la desactivación de las jaulas, las partículas comienzan a depositarse por asentamiento y/o desplazarse lateralmente (parte derecha de la figura 12 – t_sense) debido a los movimientos brownianos, partiendo de la posición de equilibrio estable (PEQ) que asumen cuando están enjaulados. Debido a estos desplazamientos, los niveles de grises detectados en jaulas completas varían de una manera sustancialmente más elevada con respecto a las variaciones de los niveles de grises asociados con el ruido térmico del circuito de lectura y/o del sistema de luz que se producen en los sensores (pixel) en relación con jaulas vacías.

La clasificación de jaula vacía o llena se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 35 1. Se adquiere una serie de imágenes (detección) mediante la operación alternada (activación o desactivación) de las jaulas (para tiempos en el orden de algunos segundos a algunas fracciones de segundo) y la detección de una o más imágenes (para tiempos en la orden de una fracción de segundo, por ejemplo 100 ms, a decenas de segundos).

- 2. Para una serie de imágenes NIMG, para cada sensor PIXEL_IJ asociado a un CAGE_IJ, se calcula la desviación estándar no normalizada del nivel de gris (en este caso particular proporcional a la potencia óptica incidente) en el sensor, definida como

$$\tilde{\sigma}_{ij-NIMG} = \sqrt{\sum_{k=1}^{NIMG} (PIXEL_IJ_k - M_IJ_{NIMG})^2}$$

$$M_IJ_{NIMG} = \frac{1}{NIMG} \sum_{h=1}^{NIMG} PIXEL_IJ_h$$

con (Valor medio del nivel de gris de PIXEL_IJ en la serie de imágenes NIMG).

- 3. Se calculan la media de desviación estándar no normalizada del nivel de gris en sensores de referencia vacíos

$$M_{REF-NIMG} = \frac{1}{NREF} \sum_{r=1}^{NREF} \tilde{\sigma}_{r-NIMG}$$

(PIXEL_REF), y la desviación estándar relativa de la desviación estándar no

normalizada
$$\sigma_{REF-NIMG} = \sqrt{\frac{1}{NREF} \sum_{r=1}^{NREF} (\tilde{\sigma}_{r-NIMG} - M_{REF-NIMG})^2}$$

4. Se define un umbral de clasificación.

$$THR = M_{REF-NIMG} + \alpha \cdot \sigma_{REF-NIMG} + \Delta$$

Los valores típicos son $\alpha=1, \Delta=0$.

5. Las jaulas IJ se clasifican como llenas, con lo que $\tilde{\sigma}_{ij-NIMG} > THR$ y las jaulas restantes se clasifican como vacías, por lo que

Es interesante para $\tilde{\sigma}_{ij-NIMG} > THR$ tener en cuenta que dicho método es independiente del ruido de patrón fijo (ruido espacial fijo ligado a la dispersión de las características de los fotodiodos), ya que considera la potencia de la señal con respecto al valor promedio por sensor, pero deja fuera el valor absoluto de dicho valor medio.

- 10 Normalmente es suficiente llevar a cabo una serie de mediciones (es decir, adquirir varias imágenes) NIMG = 50-100 para obtener una precisión superior al 95%.

Se puede obtener una medición dinámica del número de imágenes NIMG que se tiene que adquirir, teniendo en cuenta el número de imágenes necesarias para converger la desviación estándar (normalizada) de los píxeles de referencia

15
$$\sigma_{r-NIMG} = \sqrt{\frac{1}{NIMG} \sum_{k=1}^{NIMG} (PIXEL_r_k - M_r_{NIMG})^2}$$

a su valor asintótico.

Este valor asintótico es constante si el ruido 1/f que se une a las variaciones de luz es despreciable (donde f es la frecuencia general en la que se considera el ruido).

- 20 Por lo tanto, en términos más generales, el método que se acaba de describir con una referencia específica al caso del uso de sensores ópticos permite realizar la detección de la presencia de partículas (BEADS), si existen, existentes en puntos de equilibrio estable (PEQ) de cualquier campo (F) de fuerza (por lo tanto no sólo a un dielectroforético) que actúa sobre las partículas (por ejemplo células) y que se genera por una matriz de electrodos (EL). Dicho método incluye las etapas de:

- i. desactivación del campo (F) de fuerza;
- 25 ii. medición, en al menos un intervalo de tiempo posterior a la desactivación y seleccionado en función de la dinámica de los movimientos de asentamiento y/o brownianos a los que se someten las partículas con un campo desactivado, el nivel de gris que se genera por los primeros sensores (PIXEL_IJ) que se asocian con puntos de equilibrio estable (PEQ) y por segundos sensores (PIXEL_REF) que se asocian con regiones espaciales que ciertamente no se pueden ocupar por partículas debido a la configuración actual del campo (F) de fuerza ;
- 30 iii. reactivación del campo (F) de fuerza;
- iv. repetición de los pasos i) a iii) una cantidad de veces, sustancialmente comparable con la tasa de convergencia a su valor asintótico, de la varianza de los valores de nivel de gris medidos en los segundos sensores, que se asume como referencia (PIXEL_REF);
- 35 v. clasificación de un punto de equilibrio que se ocupa por partículas si, en la serie temporal considerada de mediciones, la desviación estándar de los valores de nivel de gris detectados en los primeros sensores, asociada con dicho punto de equilibrio (PEQ), resulta superior a un valor de umbral prefijo (THR).

Método para la detección de las jaulas completas por movimiento de jaulas y medición de la diferencia del valor estático de los niveles de grises.

- 40 La figura 10 muestra los pasos de una secuencia de operaciones de acuerdo con el presente método para detectar las jaulas completas a través de un movimiento de las mismas y un análisis de los valores estáticos de los niveles de grises.

1. En un primer instante (t_0) las jaulas (CAGE) colocan las partículas (BEADS) sobre conjuntos respectivos de sensores ópticos iniciales (PIXEL_STA). Se adquiere una imagen nueva con los niveles de gris correspondientes a esta configuración.
 - 5 2. Al tiempo siguiente (t_1), una vez se agota el transiente que se une al movimiento de las jaulas, las partículas se disponen en correspondencia con los sensores ópticos finales (PIXEL_TGT). Se adquiere una imagen nueva con los niveles de gris correspondientes a esta configuración.
 3. Se determina la imagen de diferencia de los niveles de grises en relación con las imágenes de los puntos 1 y 2.
 4. Se determina el valor absoluto de la imagen de diferencia.
 - 10 5. Se determina el nivel de gris resultante para los pares de píxeles (PIXEL_STA, PIXEL_TGT) que se relacionan con las posiciones inicial y final de cada jaula.
 6. Los pasos del 1 al 4 se repiten NDIFF veces y se acumulan los niveles de gris para cada jaula en relación con la variación absoluta determinada en el paso 5.
 7. Análogamente a lo que se ha descrito anteriormente para la clasificación con activación/desactivación de las jaulas, se determina un umbral de clasificación THR, considerando, esta vez, el promedio y la desviación estándar del valor absoluto de las diferencias correspondientes a los sensores ciertamente vacíos (píxeles) (tales como, por ejemplo, los píxeles entre hileras de jaula), para todas las imágenes NDIFF de diferencia que se adquieren.
 - 15 En términos más generales, la detección de la presencia de partículas (BEADS) existentes, en su caso, en puntos de equilibrio estable (PEQ) de un campo (F) de fuerza que actúa sobre las partículas, generado por una serie de electrodos (EL), se lleva a cabo al
 - 20 i) medir primero el nivel de gris generado por los primeros sensores (PIXEL_STA) asociados con puntos de equilibrio estables (PEQ), y por sensores de referencia (PIXEL_REF) asociados a zonas espaciales que ciertamente no se pueden ocupar por partículas en esta primera configuración de corriente del campo (F) de fuerza ;
 - 25 ii) luego, modificar el campo (F) de fuerza para impartirle una segunda configuración de corriente en la que los puntos de equilibrio estable se desplazan en correspondencia con segundos sensores (PIXEL_TGT), diferentes de los primeros sensores;
 - iii) luego, medir el nivel de gris generado por los segundos sensores (PIXEL_TGT) y sensores de referencia (PIXEL_REF) asociados con zonas espaciales que no se pueden ocupar por partículas en la segunda configuración de corriente del campo (F) de fuerza;
 - iv) determinar la diferencia (DIFF_IMG) entre los valores de nivel de gris detectados en los puntos precedentes;
 - 30 v) repetir los pasos i) a iv);
 - vi) procesar valores de nivel de gris diferenciales para clasificar los puntos de equilibrio estable (PEQ) ocupados por partículas y los no ocupados.

Dicho procesamiento incluye las etapas de vii) determinar el valor absoluto de las diferencias en los niveles de grises, y entonces

 - 35 viii) clasificar como ocupados los puntos de equilibrio asociados con sensores para los cuales se detecta una variación sustancialmente mayor que la variación media del nivel de gris asociado con sensores de referencia que no se pueden ocupar por partículas en la primera y segunda configuraciones del campo (F).
- Este método, que se basa en el valor absoluto de las diferencias de imagen, es también inmune al ruido de patrón fijo y, al igual que al método con activación/desactivación de las jaulas, es bastante insensible a la irregularidad en la iluminación.
- 40 Con respecto al primer método, tiene la desventaja de requerir circuitos para el desplazamiento de las jaulas y una distancia entre las mismas que permite que un movimiento de las mismas determine de una manera unívoca el desplazamiento de la célula enjaulada, si lo hay.
- 45 Una de las ventajas de este método es que se requieren típicamente unas pocas imágenes (y tiempos reducidos) para obtener una cierta calidad de clasificación (bajas posibilidades de error) que, con el método de activación/desactivación de las jaulas, requiere más imágenes y más tiempo.
- En la figura 11, se muestra el resultado que se puede obtener con una sola etapa (NDIFF = 1). En la figura 11 (a) se muestra la imagen detectable por el microscopio óptico, en la figura 11 (b) se muestra el mapa de los valores de gris correspondientes (con una compensación del ruido de patrón fijo) y por el contrario, en la figura 11 (c) se muestra la

imagen normalizada del valor absoluto de la diferencia entre la imagen con valores de gris iniciales y después de un desplazamiento hacia la derecha.

Método para la detección de jaulas completas a través del movimiento de jaulas y medición del valor dinámico de los niveles de grises.

- 5 La figura 2 muestra las formas de onda en las etapas de los métodos para la detección dinámica de la presencia de partículas en las jaulas a través del desplazamiento de las propias jaulas.

Al principio se realiza un desplazamiento de las jaulas sin esperar el asentamiento de las partículas en su nueva posición de equilibrio y se detectan las variaciones de señal de los sensores ópticos por encima del cual se mueven las células que contienen las jaulas móviles.

- 10 La Fig. 4 muestra una secuencia de pasos que implica el movimiento de la jaula en la posición IJ y el desplazamiento del punto de equilibrio (PEQ) que determina el paso sobre la partícula (BEAD) sobre el sensor óptico (PIXEL_IJ).

- 15 Si las dimensiones de la partícula (BEAD) son mayores que las del electrodo, el sensor medirá una variación pero no alcanzará el valor base relativo al pixel sin partículas por encima de él. En este caso, se puede adoptar un diagrama ligeramente diferente, como en la figura 9. En este caso, al medir el valor de gris en el pixel (PIXEL_IJ) sobre el borde de una jaula con dimensiones mayores que un electrodo, se reproduce una situación correspondiente a la de tener electrodos con dimensiones dobles que las dimensiones reales del electrodo.

- 20 Esta técnica permite, en un sentido, explorar la célula al detectar los valores de gris que se asocian con la potencia incidente considerando la integral con respecto a las secciones horizontales de la misma (si el fotodiodo es tan grande como la célula y éste se mueve verticalmente). Al cambiar el ciclo de trabajo de la ejecución, se obtiene una velocidad de exploración diferente.

- 25 Estas operaciones permiten detectar la presencia de partículas basadas en los $\frac{t_{act}}{(t_{act} + t_{sense})}$ picos y valles de luminosidad que se producen cuando la jaula está llena. Mediante el procesamiento de las señales de los sensores, un experto en la técnica puede detectar fácilmente una serie de parámetros (por ejemplo, la amplitud del pico-pico del valor de gris) que permiten discriminar las jaulas completas de las jaulas vacías.

Por lo tanto, de acuerdo con esta variante del método implementado por el aparato de la invención, la presencia de partículas existentes (BEAD), si las hay, en puntos de equilibrio estable (PEQ) de un campo (F) de fuerza que actúa sobre las partículas, generado por una serie de electrodos (EL) se detecta al llevar a cabo las siguientes etapas:

- 30 i. modificar el campo (F) de fuerza para mover los puntos de equilibrio estable (PEQ) al pasar por las partículas (BEADS) en correspondencia con los respectivos sensores (PIXEL_IJ);
- ii. medir el nivel de gris generado por los sensores (PIXEL_IJ) que se asocia al paso de los diferentes puntos de equilibrio estable (PEQ) con una frecuencia sustancialmente mayor que el tiempo de asentamiento de las partículas en la nueva posición de equilibrio;
- 35 iii. clasificar la presencia o la ausencia de partículas a través de la medición de parámetros característicos de la evolución temporal de la medida del nivel de gris generado por los sensores, por ejemplo con bases en la potencia óptica incidente en el caso de sensores ópticos.

- 40 La medición del nivel de gris generado por los sensores, es decir, la potencia óptica que impacta sobre el mismo, puede llevarse a cabo obviamente alternando también las etapas de activación del campo que actúa sobre la partícula; y la desactivación del mencionado campo, con el fin de medir, luego, la potencia óptica incidente, es decir el nivel de gris que así se obtiene; esto es ventajoso para evitar cualquier interferencia entre las tensiones de ejecución con la lectura de los sensores, incluso si en principio no es necesario si hay una independencia sustancial de los sensores de la activación de las tensiones de ejecución.

- 45 Los parámetros de la evolución temporal de la medición de la potencia óptica incluyen preferiblemente la amplitud pico a pico del nivel de grises y preferiblemente la clasificación tiene lugar a través de la comparación con un valor umbral determinado a partir de mediciones pico a pico de la potencia óptica, es decir, el nivel de grises, en sensores de referencia que no se pueden ocupar por partículas con la configuración del campo (F) de fuerza considerado, que se incrementa por un factor proporcional a la desviación estándar de los valores pico a pico de los sensores de referencia.

- 50 De este modo, también se obtiene la compensación del ruido 1/f debido a la iluminación ambiental existente en los sensores de referencia.

Método para el recuento de células con base en el número de jaulas completas, con compensación de error.

Mediante los métodos descritos anteriormente, se determina entonces el número de jaulas completas. El objetivo de la presente divulgación es también encontrar un aparato para implementar un método para el recuento de las células en las jaulas. A partir de esto, se conoce el volumen de la muestra considerada, también se obtiene la concentración de las células.

5 Como primera aproximación, especialmente si el número medio de células por jaula es sustancialmente inferior a aproximadamente 0,1, el número de jaulas completas es aproximadamente similar al número de células (en este caso hay una subvaluación del número de células de aproximadamente 5 %). Para un número medio más alto de células, de acuerdo con la presente divulgación, se pueden compensar las estadísticas de distribución de las células por jaulas, para obtener un recuento que se aproxima con mayor precisión al número real de células en el chip.

10 Asumimos que se producen las siguientes suposiciones:

1. Las células se distribuyen uniformemente por unidad de volumen; esta hipótesis se verifica globalmente en los casos en que la muestra se inyecta en la microcámara vacía. Si, por el contrario, la muestra se inyecta en la microcámara previamente llena de regulador, la muestra podría ser sólo localmente uniforme, debido a las variaciones de densidad de células unidas al perfil de flujo de la muestra.

15 2. Se pueden ignorar los enlaces que se conectan con el número máximo de células por jaula.

Esta hipótesis se verifica cuando el volumen total de las células (volumen medio de una célula por número medio de células) es razonablemente menor que el volumen de una jaula (que se prevé como el volumen de la cuenca de atracción de cada jaula).

Bajo estas hipótesis, la distribución estadística de las células se representa por la distribución binomial. Definimos:

20 NCAGES = número de jaulas en el chip (o parte considerada)

n = NCELLS = número de células en el chip (o parte considerada)

En el que por "chip" se entiende la serie formada por la serie de electrodos EL, que se integra precisa y normalmente en un solo chip multicapa junto con los sensores PIXEL.

Entonces, la probabilidad de que una célula pertenezca a la cuenca de atracción de cualquier jaula es:

25
$$p = 1/NCAGES$$

La probabilidad de tener células k por jaula resulta de la fórmula:

$$P[k] = \binom{n}{k} \cdot p^k \cdot (1-p)^{n-k}$$

donde es

$$\binom{n}{k} = \frac{n!}{k!(n-k)!}$$

30 el número de combinaciones de n objetos tomados k a la vez (distribución binomial).

El valor medio de las células por jaula (Células Promedio Por Jaula - ACPC) es

$$ACPC = \langle P[k] \rangle = p \cdot n = \frac{NCELLS}{NCAGES}$$

35 Como en el chip típicamente hay muchas jaulas, la probabilidad de tener 1, 2, ... k células por jaula, multiplicado por el número de jaulas, se aproxima bien al valor real de jaulas con 1, 2, ... k células. Teniendo en cuenta esto, y el número total de jaulas vacías y completas que se detectan, se puede estimar el valor medio de células por jaula (ACPC), calculando el valor que proporciona un número esperado de jaulas llenas y vacías correspondientes al valor detectado.

El valor esperado de las jaulas vacías se calcula como

$$EC_{estimate} = NCAGES \cdot P[0] = NCAGES \cdot (1-p)^n = NCAGES \cdot \left(1 - \frac{1}{NCAGES}\right)^{NCELLS}$$

y al sustituir el valor de las jaulas vacías realmente detectadas, se obtiene entonces el recuento de células, que se puede calcular con pasos simples tales como

$$NCELLS_{measure} = \frac{\log(NCAGES) - \log(EC_{measure})}{\log(NCAGES) - \log(NCAGES - 1)}$$

5 Se obtiene así una mejor estimación del número de células y la precisión del recuento resulta también buena para valores ACPC superiores a uno, siempre que el número de jaulas vacías y llenas sea estadísticamente significativo; de esta manera, de hecho, se mitiga el error ligado a la subevaluación del número de células que se asocia de otro modo con el recuento de las jaulas completas. Obviamente, el número que se detecta de jaulas vacías (EC_{medida}) debe ser mayor de cero y resulta menor o igual al número de jaulas NCAGES. La siguiente tabla muestra numéricamente el caso de un ejemplo particular con 6400 jaulas, y diferentes concentraciones de células. Como
 10 puede observarse, el error de recuento se reduce drásticamente, especialmente para altas concentraciones medias de células por jaula. En realidad, el valor que se reporta es simplemente el que se basa en la densidad de probabilidades, pero dado el gran número de jaulas, la estimación de probabilidad se aproxima bien a un posible valor medido.

5 En otras palabras, de acuerdo con este método, a partir del recuento de jaulas llenas y vacías, que se realiza de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos hasta ahora, se puede derivar el recuento del número total de partículas (por ejemplo células) actualmente existentes en una muestra inyectada en una cámara definida por la serie de electrodos EL y la tapa (LID), si la hay; el paso de recuento de las partículas individuales, cuya presencia general se ha detectado previamente, se lleva a cabo de acuerdo con este aspecto de la divulgación de una manera estimada sobre bases estadísticas, como sigue:

10 a) el número (EC_{medida}) de puntos de equilibrio estable (PEQ) existentes en el campo (F) generado por la serie de electrodos (EL) - puntos de equilibrio estable, que también se muestran aquí como - jaulas- que no contienen ninguna partícula (BEAD) se mide mediante los sensores.

15 b) el recuento (NCELLS) de las partículas (BEAD) se determina como la relación de la diferencia entre el logaritmo del número (NCAGES) de puntos de equilibrio estable (PEQ) y el logaritmo del número medido (EC_{medida}) de los puntos de equilibrio estable (PEQ) que no contiene ninguna partícula y la diferencia entre el logaritmo del número (NCAGES) de puntos de equilibrio estable (PEQ) y el logaritmo del número (NCAGES-1) de los puntos de equilibrio estable) menos uno.

Método de caracterización de las células en las jaulas mediante el movimiento de las jaulas y medición del valor dinámico de los niveles de grises.

20 Como se muestra en la figura 3, dado que una bola (por ejemplo, la figura 3 (a)), una célula de un tipo (por ejemplo, un K562, como en la figura 3 (b)), o una célula de otro tipo (ej., un glóbulo rojo como en la figura 3 (c)), tienen diferentes dimensiones, forma, perfil de absorbancia e índice de refracción, al pasar la jaula en un sensor es posible detectar no sólo si está lleno sino también, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, para caracterizar el tipo de la partícula existente, si la hay.

25 Una célula (y ciertos tipos de microbolas) muestran una distorsión de luz (una especie de efecto de lente) que provoca una variación del nivel de gris con picos negativos (bordes oscuros en la célula) y picos positivos (centro más brillante donde la célula concentra la luz) del nivel de grises.

30 Los parámetros que se ligan a la evolución dinámica del nivel de grises, tales como, mediante un ejemplo significativo, pero no limitante, que se informa en la figura 5, la medida de la amplitud de los picos negativos (G_{np}) y positivos (G_{pp}) del gris, así como, por ejemplo, el tiempo de retraso (t_d) entre el movimiento de la jaula y la detección de la primera variación de gris, o también la longitud temporal de las variaciones que se pueden usar para obtener información adicional y clasificar el tipo de célula.

Fórmulas:

35 La velocidad de desplazamiento es, como una primera aproximación, proporcional a la movilidad dielectroforética, y resulta $v \propto k R^2$. Por tanto, la longitud de la variación de los niveles de grises, como primera aproximación, resulta, a saber, inversamente proporcional al radio de la partícula (disminuye cuando R aumenta). El tiempo de retraso t_d

entre $t_w = \frac{2R}{kR^2} \propto \frac{1}{R}$, la ejecución y el inicio de la variación del nivel de gris resulta como una primera aproximación (en el caso de la figura 4, con una célula en un solo electrodo) es igual a

(También disminuye cuando R aumenta).

La figura 6 muestra el curso real que se mide para una célula K562.

40 La Fig. 7 muestra el curso típico que se espera para bolas no transparentes, o

$$t_d = \frac{W_{ul} - R}{kR^2}$$

células pequeñas para las cuales predomina el efecto de la absorbancia en comparación con el efecto "lente" antes mencionado.

45 La figura 8 muestra la evolución temporal del valor de gris que se detecta en el paso de bolas de poliestireno de 10 μm , 6 μm y 3 μm después del desplazamiento de su jaula.

Al extraer parámetros de discriminación oportunos, es posible, de manera aparente para los expertos en la técnica, definir un criterio de clasificación, similarmente a lo que se ha mencionado anteriormente para la clasificación de jaulas vacías y llenas.

En particular, el método de identificación puede incluir la extracción de las características discriminantes de las partículas, y el uso de algoritmos que se basan en redes neuronales, primeros acercamientos ks, algoritmos de umbrales y/o Análisis de Componentes Principales, o una combinación de los mismos.

5 La figura 14 muestra una técnica alternativa que se basa en el mismo principio, a través de la cual es posible escanear la célula en su sección horizontal con una mayor resolución, al desplazarla lateralmente por encima del sensor. De hecho, la "rebanada" de la célula considerada tiene dimensiones más bajas. A partir de la derivada del valor de gris a medida que pasa la célula, se puede calcular el valor puntual del valor de gris a lo largo de una sección horizontal de la célula, con una resolución horizontal igual al número de puntos durante la adquisición y una resolución vertical igual a la separación (distancia) entre los electrodos.

10 Al basarse en lo que se ha descrito anteriormente, resulta por lo tanto evidente que la divulgación también permite caracterizar partículas (BEADS) (es decir, establecer su naturaleza física) presentes en puntos de equilibrio estable (PEQ) de un campo (F) de fuerza que actúan sobre las partículas y que se generan por una serie de electrodos (EL), a través de la realización de las siguientes etapas:

15 a. modificar el campo (F) de fuerza para desplazar dichos puntos de equilibrio estable (PEQ) al pasar dichas partículas (BEADS) en correspondencia con los respectivos sensores (PIXEL_IJ);

b. medir el nivel de gris detectable por los sensores (PIXEL_IJ) que se asocia al tránsito de diferentes puntos de equilibrio estable (PEQ) que contienen partículas, con una frecuencia sustancialmente mayor que el tiempo de asentamiento de las partículas en la nueva posición de equilibrio;

20 c. procesar parámetros característicos de la evolución temporal de la medición del nivel de gris para estimar la naturaleza de las partículas.

El todo siempre sin verse afectado por el "ruido" de fondo detectable por los sensores, es decir, el ruido de patrón fijo.

25 En el ejemplo descrito, donde los sensores que se usan son sensores ópticos y la medición del nivel de grises es una medición de la potencia óptica que impacta sobre los sensores, dicha medición se lleva a cabo preferiblemente alternando las etapas de:

i. activar el campo que actúa sobre la partícula;

ii. desactivar el campo y medir la potencia óptica incidente;

30 o al usar el mismo sistema preferido descrito anteriormente para la detección dinámica de la presencia de partículas en las jaulas. Los parámetros de la evolución temporal de la medición de la potencia óptica incluyen, con base en lo que se ha descrito anteriormente, al menos uno de los parámetros seleccionados del grupo que consiste en:

i. el retraso (td) entre la variación del campo (F) de fuerza y la primera variación de la potencia óptica

ii. la longitud (tw) de la variación transitoria de la potencia óptica;

iii. la amplitud del pico positivo (Gpp) del valor de potencia óptica;

iv. la amplitud del pico negativo (Gnp) del valor de potencia óptica.

35 Método para el recuento de diferentes especies de células en una muestra heterogénea

Mediante la combinación de las metodologías para el recuento de células para una población única con la caracterización de las partículas en las jaulas individuales, es posible, de acuerdo con la presente divulgación, determinar la composición de una muestra con tipos heterogéneos de partículas.

40 Generalmente, no es fácil diferenciar la composición de partículas en jaula que contienen más de una célula. Sin embargo, al procesar la dinámica del nivel de grises, que se registra como se ha descrito anteriormente para la caracterización del contenido de una jaula, es relativamente sencillo determinar si la jaula contiene una sola partícula o una multiplicidad de partículas (MC).

45 Puesto que se puede suponer que la distribución de diferentes tipos de partículas es independiente (ortogonal) entre ellas, al combinar el número de partículas de cada tipo que se obtiene en las jaulas con una sola partícula, y la información que se relaciona con el número de jaulas vacías (CE) y el número total de jaulas, por lo tanto es posible determinar la estimación del número de partículas de las diferentes poblaciones, a través de una ruta numérica. El problema es la minimización de una función con diferentes NPT (donde NPT = número de tipos de partículas). En la Fig. 21 se presenta una representación del problema en el caso de NPT = 3.

50 Para cada tipo de partícula $t = 1, \dots, NPT$, una vez que se ha supuesto la presencia de un número de partículas (NCELLSt), el volumen del hipercubo del espacio a dimensiones NPT que representa el número de partículas del

- tipo t que existen en una sola jaula (al ignorar los otros tipos de partículas), se mantiene, de hecho, fijo (Pt_1) Con referencia a la Fig. 21 (a), para las partículas de un primer tipo, se obtienen $P1_1$ partículas en una sola jaula , partículas $P1_M$ en jaulas múltiples y $P1_0$ jaulas sin partículas del tipo $P1$ (las medidas de los volúmenes mostrados). Se debe tener en cuenta el número de partículas tipo t que se detectan en una sola jaula, sin embargo,
- 5 una o más partículas de otros tipos pueden presentarse en las mismas jaulas. Por lo tanto, como se muestra en la figura 21 (d), el valor detectado de partículas individuales (Pt_1_MEAS) de cada tipo t corresponde al volumen (Pt_1) del hipercubo de partículas de tipo t menos el volumen de los hipercubos de intersección entre Pt_1 y Pq_h , con $q <> t$ y $h > 0$ de hipercubos que contienen al menos una partícula de un tipo diferente. Se conoce además el volumen del hipercubo de las jaulas vacías (EC_MEAS).
- 10 El múltiplo t de valores $NCELLSt$, $t = 1, \dots, NTP$ se calcula por vía numérica, por lo que el valor esperado (estadísticamente) corresponde mejor al número (Pt_1) de jaulas que realmente se mide con una sola partícula de cada tipo t y de jaulas vacías (EC_MEAS).
- Al basarse en lo que se acaba de describir, resulta por lo tanto evidente que la divulgación también permite contar el número de partículas (BEADS) de una multiplicidad de tipos (NTP) que existen en puntos de equilibrio estable (PEQ) de un campo de fuerza F que actúan sobre las partículas y que se generan por una serie de electrodos (EL), a través de la ejecución de las siguientes etapas:
- 15 a. modificar el campo (F) de fuerza para desplazar dichos puntos de equilibrio estable (PEQ) al pasar dichas partículas (BEADS) en correspondencia con los respectivos sensores (PIXEL_IJ);
- b. medir el nivel de gris detectable por los sensores (PIXEL_IJ) que se asocia con el paso de los diferentes puntos de equilibrio estable (PEQ) que contienen partículas, con una frecuencia sustancialmente superior al tiempo de asentamiento de las partículas en la nueva posición de equilibrio;
- 20 c. procesar parámetros característicos de la evolución temporal de la medida de nivel de gris que se asocia a cada punto de equilibrio estable (PEQ) para detectar si la jaula asociada está vacía, si contiene una partícula de un tipo o si contiene más partículas;
- 25 d. determinar de manera numérica la combinación de recuentos de partículas de cada tipo ($NCELLSt$) que mejor se aproxima al valor medido de jaulas con una sola partícula de cada tipo (Pt_1_MEAS) y jaulas vacías (EC_MEAS).
- Aparato para la caracterización de alta resolución de las células en las jaulas a través del movimiento de las jaulas y medición del valor dinámico del nivel de grises.
- 30 Con el fin de aumentar la resolución de los métodos de detección dinámica descritos hasta ahora, de acuerdo con la presente divulgación es posible combinar (Figura 15) una serie de electrodos (EL) asociados con fotodiodos (PIXEL_V1, ... PIXEL_VN) caracterizados por una mayor resolución espacial, para analizar secuencialmente diferentes secciones de la partícula, moviéndola secuencialmente sobre diferentes electrodos.
- El límite de resolución está así determinado por la geometría mínima de la resolución fotolitográfica y no tiene la necesidad de colocar diferentes transistores para el direccionamiento de los electrodos (píxeles), lo que incrementaría el área requerida. Por ejemplo, algunas aberturas (SLITS) pueden llevarse a cabo sobre una metalización dispuesta sobre el fotodiodo, de manera que sea sensible sólo en correspondencia con la misma abertura.
- 35 De esta manera, se puede implementar una etapa adicional en todos los métodos descritos hasta ahora, en los que dichos puntos de equilibrio estable (PEQ) se desplazan de tal manera que dichas partículas (BEADS) se pasen en correspondencia con una pluralidad de dichos respectivos sensores (PIXEL_IJ); y en el que los sensores (PIXEL_IJ) son sensores ópticos y están blindados (a través de la capa de metalización anteriormente mencionada equipada con aberturas SLITS de una amplitud prefijada y relativamente pequeña), para detectar con los sensores la potencia óptica incidente sobre una porción de espacio sustancialmente menores que las dimensiones de las partículas y los propios sensores.
- 40 Método para la manipulación de células con un control automático de la velocidad de desplazamiento de las jaulas.
- Un método de manipulación con un control automático de la velocidad de desplazamiento de las jaulas se puede basar entonces en el uso de la detección de paso de las células, como se ha descrito anteriormente. Para las jaulas con células que se mueven sobre el chip (junto con la serie de electrodos) se puede monitorizar la evolución de los niveles de grises y se puede detectar el final del asentamiento transiente el nuevo punto de equilibrio para iniciar inmediatamente el siguiente paso a lo largo de la trayectoria. Además de la optimización de los tiempos, al adaptarlos dinámicamente a la velocidad de las diferentes partículas en los diferentes momentos, aproximación que también permite verificar que cada célula no queda bloqueada.
- 50 Si a cada electrodo se le asocia un único sensor óptico, por ejemplo en la separación vertical (distancia) entre dos electrodos, como en la figura 4, método que se lleva a cabo utilizando jaulas con una anchura de 1×2 electrodos (1 en posición horizontal $\times 2$ en posición vertical). En el desplazamiento horizontal, de hecho, la partícula se sitúa a
- 55

toda velocidad sobre el sensor entre los dos electrodos, y se puede seguir su movimiento a través de la supervisión del sensor en correspondencia con el punto inicial y/o final de equilibrio. Esto introduce un enlace en la forma de la jaula, que sin embargo se puede superar usando un aparato como se describe a continuación.

5 Aparato para la manipulación de células con control automático de la velocidad de desplazamiento de las jaulas, sin límites en las dimensiones de las mismas.

10 En la figura 16, se muestra el diagrama de un aparato con sensores (píxeles) para la determinación del movimiento tanto en dirección horizontal (PIXEL_H) como en dirección vertical (PIXEL_V). Dicho aparato es ventajoso para implementar una manipulación de partículas con un control de cadena estrecha, que se realiza de manera integrada con la de la velocidad de desplazamiento de las jaulas. Con este aparato se puede realizar el desplazamiento horizontal también con jaulas 1 x 1, ya que la célula/partícula pasa en cualquier caso al sensor (PIXEL_H) que se coloca entre dos electrodos a lo largo del eje horizontal.

15 Con el método y aparato adicional que se describen ahora, se implementa una etapa aplicable a todos los métodos de detección y caracterización de partículas mencionados previamente, que consiste en el control del curso de variación en el nivel de grises detectable por los sensores (PIXEL_IJ) que se asocian con el paso de los puntos de equilibrio estable (PEQ) que contienen partículas, para determinar el final del asentamiento transiente de las partículas en la nueva posición de equilibrio y retroceder desde esta medida a la velocidad de desplazamiento de las partículas (BEADS) hacia nuevos puntos de equilibrio estable (PEQ). Al final de dicho asentamiento transiente, se puede generar automáticamente una variación en el campo (F) de fuerza que se produce por los propios electrodos (por ejemplo, a través de un software apropiado que se implementa en una unidad de control CTRL, además de un tipo conocido, de la serie de electrodos EL (figura 15), con el fin de provocar un nuevo desplazamiento de los puntos de equilibrio estable (PEQ) a lo largo de la trayectoria prefijada que se desea (que se muestra en la figura 15 mediante la flecha).

Aparatos con filtros dicroicos que se integran para la detección y/o caracterización de las células en las jaulas por fluorescencia

25 Para la detección de fluorescencia y/o la caracterización de células, se describen algunas implementaciones preferidas de acuerdo con la presente divulgación. Estas implementaciones integran un elemento filtrante que permite el paso de la emisión de fluorescencia pero mitiga la excitación. Estos elementos filtrantes se pueden integrar con pasos de proceso aguas abajo de la ejecución del chip, tales como depósitos de película delgada de materiales con índices de refracción oportunos para realizar filtros dicroicos. El efecto de filtro permite mitigar la parte de potencia óptica en la banda de excitación que se detecta mediante el sensor (PIXEL), reduciendo así los requisitos vinculados al rango dinámico del propio sensor.

35 En la Figura 18, se muestra el diagrama de un aparato que se adecúa particularmente para la detección y/o caracterización de células de fluorescencia. En el chip se deposita un filtro dicroico (DFL) que permite el paso de las frecuencias correspondientes a la emisión, con técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Después de la deposición, opcionalmente, se desea mejorar el contacto eléctrico entre un electrodo (EL) y un líquido, se abren algunas ventanas sobre la capa dicroica, en correspondencia con los propios electrodos. De esta manera, es posible, por ejemplo, usar soluciones incluso de alta conductividad, en caso de electroforesis, sin caídas de tensión que se conectan con la presencia de la capa dieléctrica que se compone del filtro dicroico. Este esquema de ejecución es compatible con el uso de una fabricación de placas CMOS estándar y sólo implica un post-procesado de las placas. Alternativamente, el filtro dicroico se puede realizar por debajo de los electrodos, tal como se muestra en la figura 19. Esto puede ser útil si se puede modificar el proceso CMOS. Además, sin la modificación del proceso CMOS, este diagrama se puede llevar a cabo al realizar un post-procesado, aunque más complejo, se representa por la aplicación del filtro, la apertura de contactos en el metal superior CMOS y la metalización adicional para realizar los electrodos (EL). Puede ser ventajoso llevar a cabo, independientemente del hecho de estar por encima o por debajo de los electrodos (EL), una multiplicidad espaciada de filtros dicroicos con una banda de paso diferente (DFL1, DFLN), como se muestra en la figura 20. Esto puede ser útil para dividir y detectar por separado la fluorescencia de células/partículas a diferentes frecuencias de emisión.

45 Evidentemente, al comprobar la posición de las células, es posible analizarlas en secuencia, en diferentes sensores, para la presencia por ejemplo de fluoróforos diferentes. De acuerdo con este aspecto de la divulgación que se acaba de describir, la invención se refiere a un aparato para la detección y/o caracterización de partículas como se ha descrito anteriormente, pero que además incluye medios de blindaje de los sensores y aberturas, en un número de al menos uno para cada sensor, que se obtiene a través de los medios de blindaje y que tiene dimensiones prefijas más pequeñas que las de las partículas a detectar/caracterizar.

55 El aparato puede incluir además al menos un filtro dicroico con una banda de paso prefijada que se dispone de tal manera que proteja al menos parcialmente los sensores (PIXEL), si éstos son sensores ópticos, e incluye preferiblemente una pluralidad de filtros dicroicos, al tener cada uno una banda de paso diferente entre las otras, que se disponen superpuestas entre ellas y para proteger al menos parcialmente los sensores (PIXEL). Si al menos un filtro dicroico se dispone para cubrir los electrodos (EL), se equipa con aberturas de interrupción que se colocan en correspondencia con al menos parte de cada electrodo.

Filtración de la excitación

5 El aparato puede aprovechar, o no, el hecho de que (externamente) la fuente de excitación se filtra y optimiza para cada fluoróforo que se va a analizar. Esto se puede llevar a cabo fácilmente con filtros no integrados en el dispositivo. Además, o alternativamente, la tapa del chip puede integrar la parte de la filtración de excitación correspondiente con filtros dicróicos subyacentes, que varían o no, de píxel a píxel del chip.

10 Si el filtro de excitación se integra en la tapa, es necesario llevar a cabo zonas más amplias con un filtro dicróico homogéneo, para evitar la interferencia entre las excitaciones de los diferentes píxeles. En este caso, la célula sometida a prueba debe cubrir una mayor distancia para poderse analizar mediante diferentes fluoróforos. De acuerdo con este aspecto adicional de la divulgación, el aparato que se describe hasta ahora puede por lo tanto incluir al menos un filtro dicróico con una banda de paso prefijada que se dispone en correspondencia con la cubierta (LID) que define, junto con la serie de electrodos (EL), una cámara o microcámara que se adecúa para recibir y que contiene una muestra de fluido que contiene las partículas a detectar/caracterizar.

Método de compensación del ruido de iluminación

15 En todos los métodos que se mencionan anteriormente, cuando se usan sensores ópticos, la señal para la detección o caracterización de las partículas depende de la potencia de iluminación. Por lo tanto, las variaciones de este tipo pueden causar algunas variaciones del nivel de la potencia óptica que se detecta, las cuales no se unen a la señal (presencia y/o posición de la partícula). Aunque normalmente esto no es un problema, se pueden mejorar los desempeños de los métodos (mayor precisión, mayor velocidad), al compensar dichas variaciones al usar un valor normalizado a la detección media de los píxeles de referencia (píxeles que ciertamente corresponden con jaulas vacías, para las cuales, la potencia óptica incidente sólo se ve afectada por la potencia de iluminación).

20 Esto es principalmente cierto para el ruido de iluminación de baja frecuencia que, debido a la densidad espectral de la potencia de ruido (proporcional a $1/f$), hace que su impacto sea más influente.

Método de compensación de ruido para sensores de impedancia.

25 En todos los métodos que se mencionan anteriormente, cuando se usan sensores del medidor de impedancia, la señal para la detección y caracterización de las partículas depende de la conductividad y la permisividad del medio de suspensión de las partículas, que a su vez depende, por ejemplo, de la temperatura, concentración de sales u otras moléculas, etc. Por lo tanto, las variaciones de estos pueden causar algunas variaciones del nivel de la impedancia detectada que no se unen a la señal (presencia y/o posición de la partícula). Aunque normalmente esto no es un problema, se pueden mejorar los desempeños de los métodos (mayor precisión, mayor velocidad), al compensar dichas variaciones usando un valor normalizado a la detección media de los píxeles de referencia (píxeles que ciertamente corresponden con jaulas vacías, para las cuales, la impedancia sólo se ve afectada por la conductividad y la permisividad del medio de suspensión).

35 En todos los métodos de detección y caracterización que se describen hasta ahora, se puede introducir una etapa adicional que consiste en una compensación de los niveles de grises detectados por dichos sensores (PIXEL_IJ), al usar un valor normalizado para la detección media de sensores de referencia (PIXEL_REF) que se asocian con regiones espaciales que ciertamente no se pueden ocupar por partículas en la configuración actual del campo (F) de fuerza considerado.

Nota sobre las aplicaciones

40 Los métodos y el aparato que se describen hasta ahora son de uso general y encuentran múltiples aplicaciones. A modo de ejemplo, pero no de limitación de la divulgación, se mencionan algunas de las aplicaciones más importantes:

45 - Análisis de muestras de sangre; al introducir una muestra en el chip (que utiliza, por ejemplo, jaulas de dielectroforesis cerradas), se pueden contar los glóbulos rojos contando como primera aproximación todas las jaulas ocupadas (de hecho las otras células que existen posiblemente tienen una concentración tan baja que resulta insignificante para la precisión que típicamente se requiere).

- Hemograma: caracterización del número y tipo de células en la sangre; en este caso, se emplea el método que se describe anteriormente para llevar a cabo una caracterización precisa de cada célula existente, clasificándola como eritrocito, plaqueta, linfocito, etcétera.

50 - Recuento de las bacterias que existen en una muestra; al inyectar en el chip (con jaulas cerradas de DEP) un volumen conocido de muestra, se detectan todas las bacterias existentes y, si es necesario, también el tipo, si se distinguen a través de su firma característica que se detecta con los sensores ópticos.

- Separación/recuento de las células marcadas con fluorescencia a partir de una población mixta. Este tipo de problema está difundido ampliamente tanto en la investigación como en el diagnóstico.

Por ejemplo, se pueden detectar bacterias en muestras lácteas, tales como leche, yogur, preparaciones para helados, etc.

Como otro ejemplo, se pueden detectar bacterias para una fermentación del mosto de uva (por ejemplo para aplicaciones enológicas).

- 5 Como otro ejemplo, se pueden detectar bacterias que existen en un volumen de agua potable.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Aparato para la detección y/o caracterización de partículas (BEADS) que comprende: medios para la generación de puntos de equilibrio estable (PEQ) de un campo de fuerza (F) que actúa sobre dichas partículas, generado por un conjunto de electrodos (EL); y sensores (PIXEL) asociados con dichos electrodos, caracterizados porque a cada electrodo (EL) están asociados un primer sensor (PIXEL_V) para detectar el tránsito de dichas partículas en una dirección vertical, y un segundo sensor (PIXEL_H) para detectar el tránsito de dichas partículas en una dirección horizontal.
- 10 2. Aparato de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dichos sensores son sensores ópticos, están ubicados en la separación entre dos electrodos adyacentes y están hechos para detectar la potencia óptica incidente en una porción de sensor sustancialmente más baja que las dimensiones de las partículas.
- 15 3. Aparato de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque comprende medios de blindaje (SHIELD) de dichos sensores ópticos y aberturas (SLIT), en un número de al menos uno para cada sensor óptico, obtenido a través de dichos medios de blindaje (SHIELD) y que tiene dimensiones prefijadas, más pequeñas que las de las partículas a ser detectadas/caracterizadas.
- 20 4. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque incluye al menos un filtro dicroico con una banda de paso prefijada dispuesta para proteger al menos parcialmente dichos sensores (PIXEL), los cuales son sensores ópticos.
- 25 5. Aparato de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque comprende una pluralidad de filtros dicroicos, cada uno de los cuales tiene una banda de paso seleccionada de un conjunto de bandas de paso diferentes, dispuestas de manera no superpuesta entre ellas y para proteger en cualquier caso al menos parcialmente dicho sensores ópticos (PIXEL).
- 30 6. Aparato de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, caracterizado porque dicho al menos un filtro dicroico está dispuesto para cubrir dichos electrodos (EL) y está equipado con aberturas de interrupción colocadas en correspondencia con al menos parte de cada uno de dichos electrodos.
- 35 7. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque comprende al menos un filtro dicroico con una banda de paso prefijada dispuesta en correspondencia con una cubierta (LID) que define junto con dicho conjunto de electrodos (EL) una cámara o un microcámara adecuada para recibir y contener una muestra fluida que contiene dichas partículas.

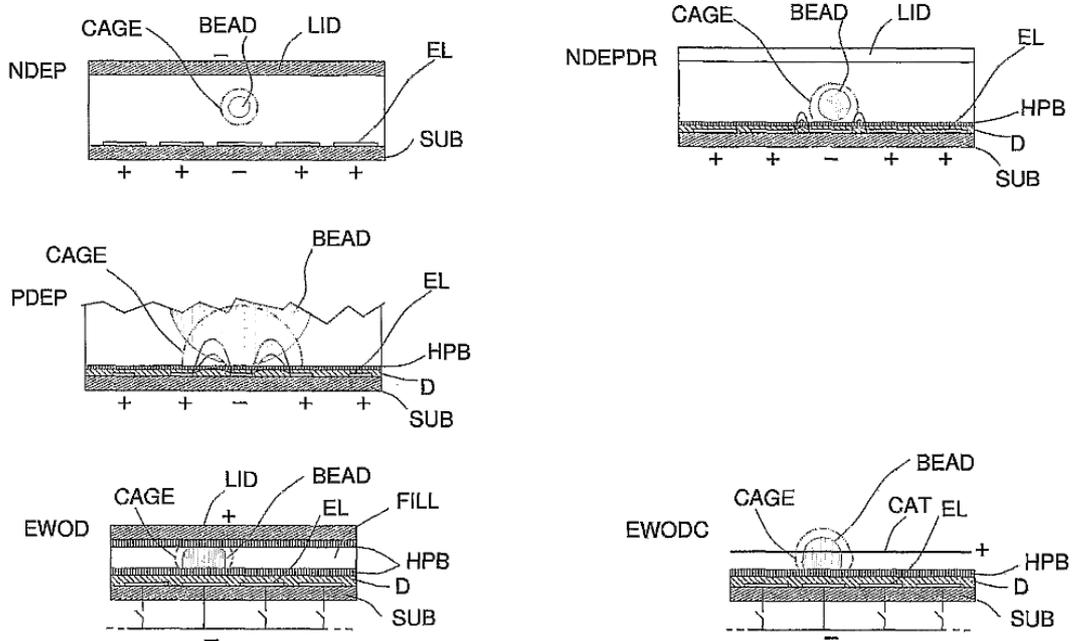


Fig. 1

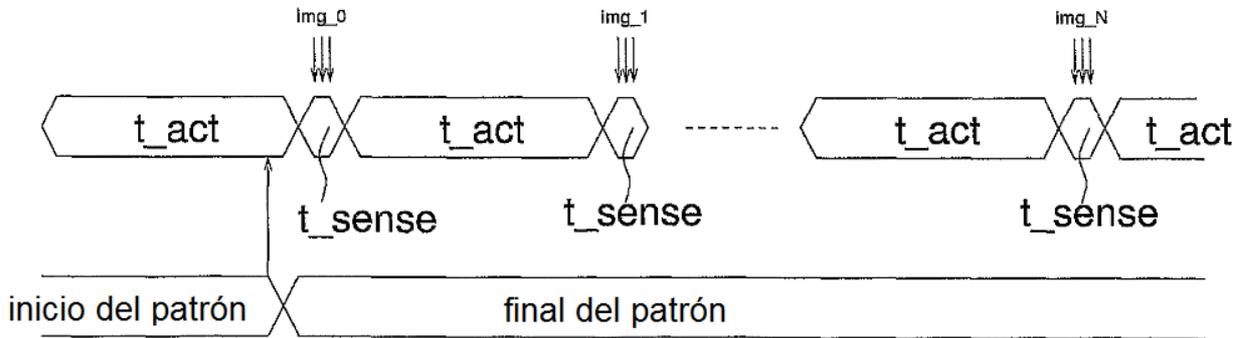


Fig. 2

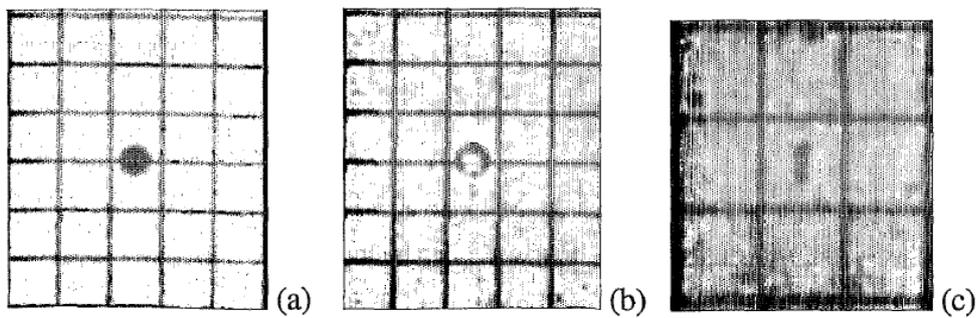


Fig. 3

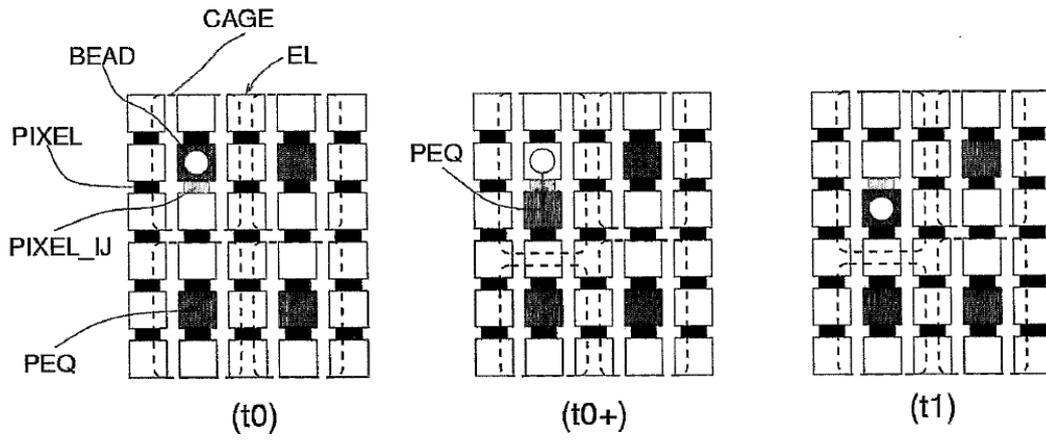


Fig. 4

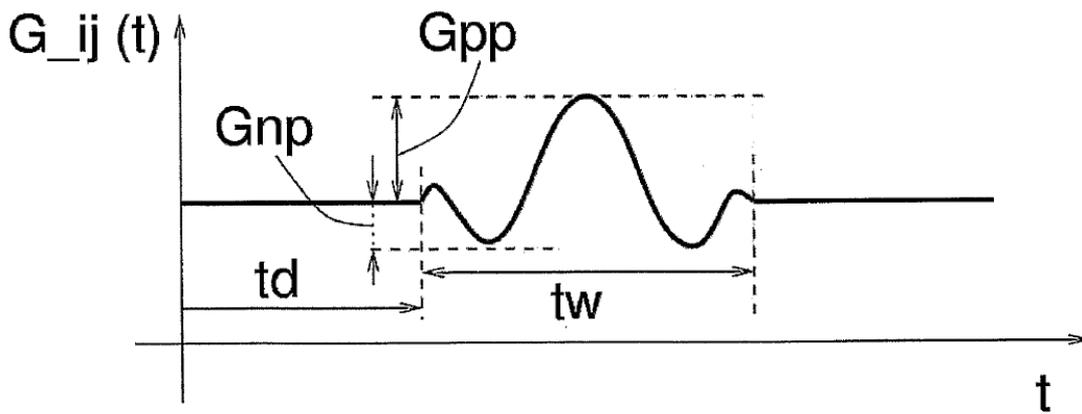


Fig. 5

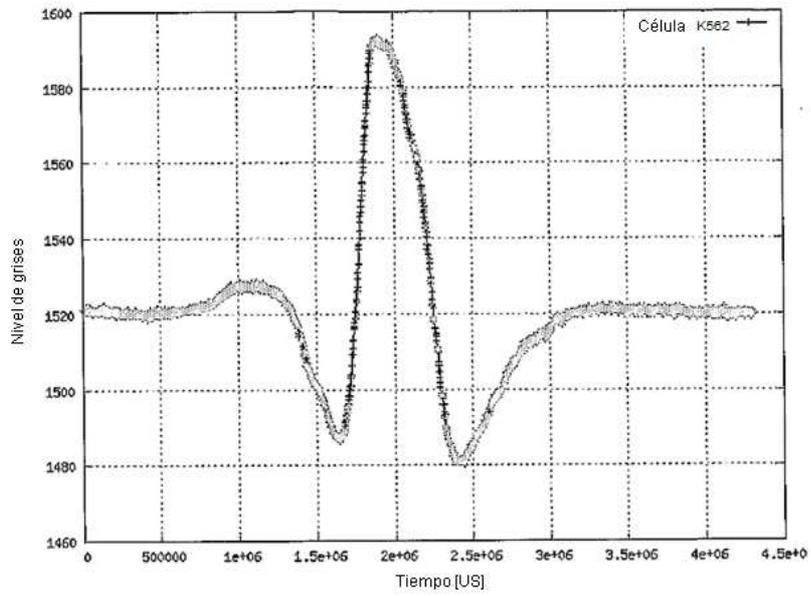


Fig. 6

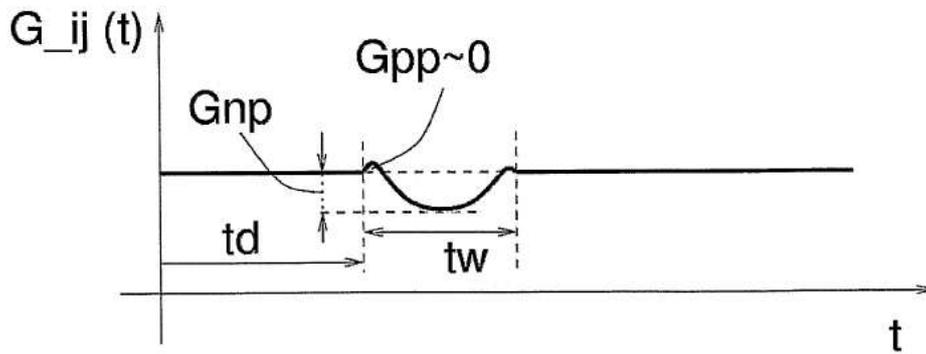


Fig. 7

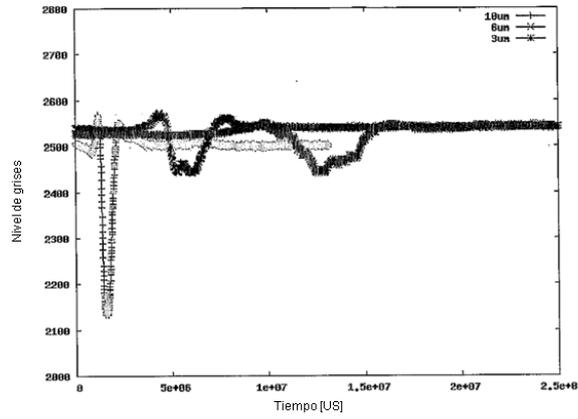


Fig. 8

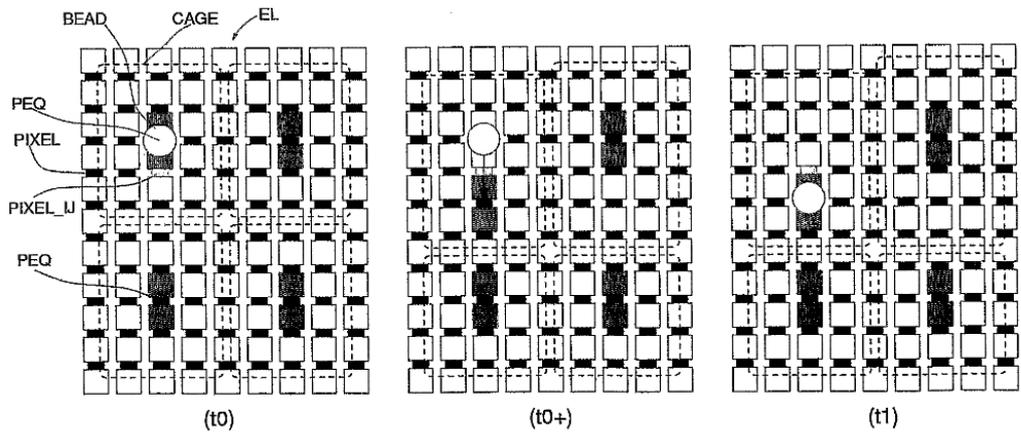


Fig. 9

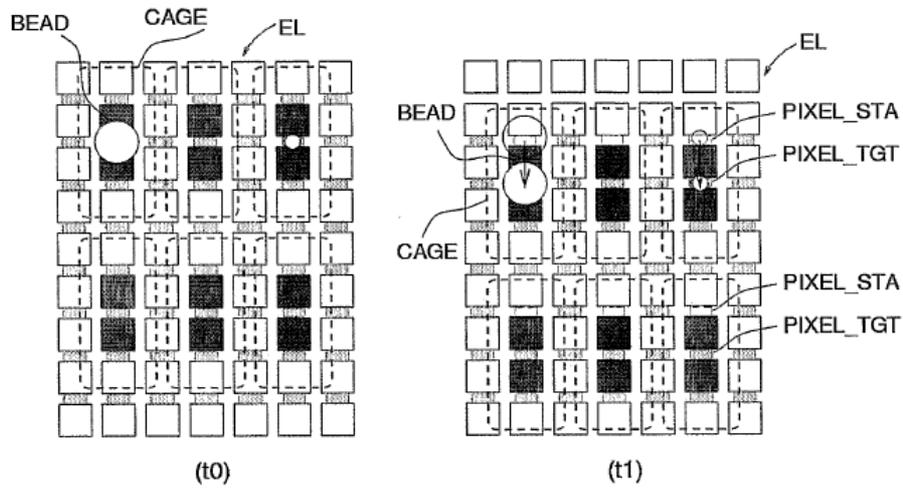


Fig. 10

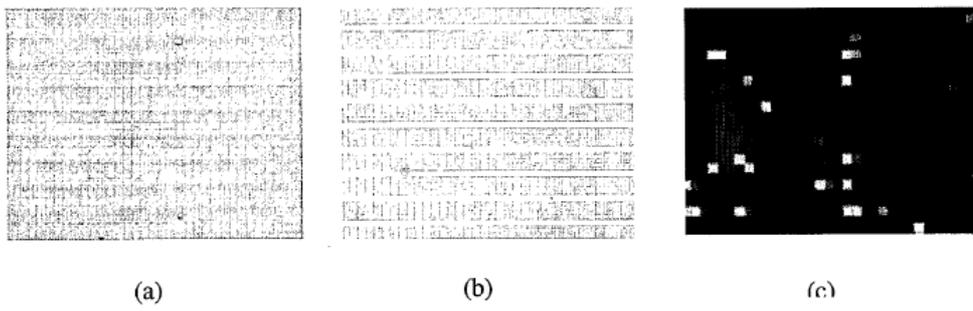


Fig. 11

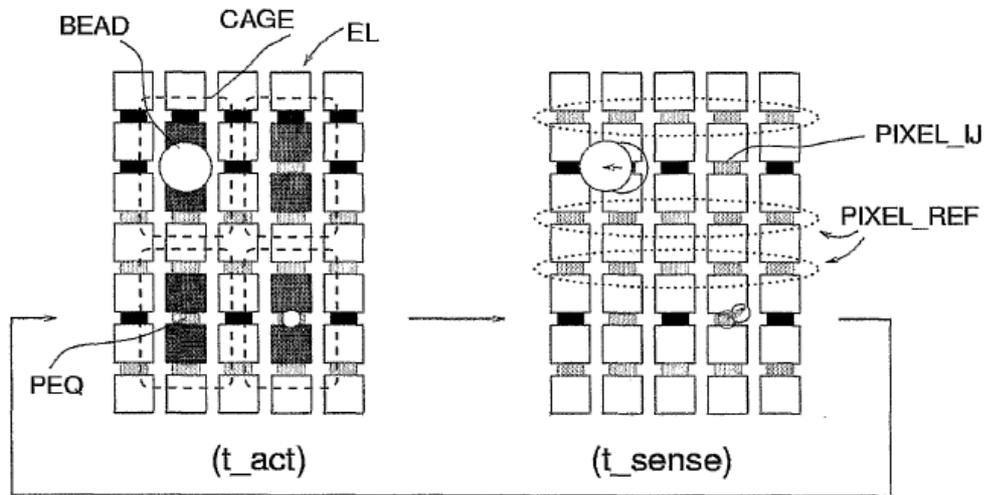


Fig. 12

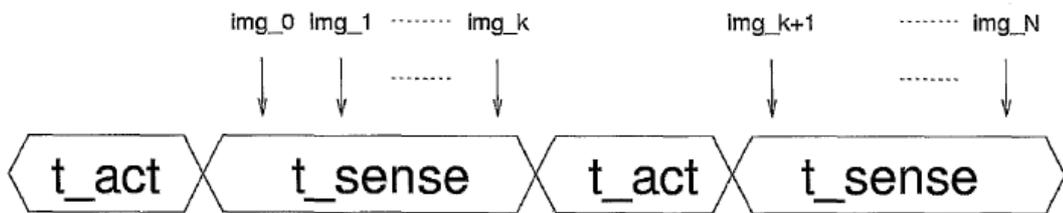


Fig. 13

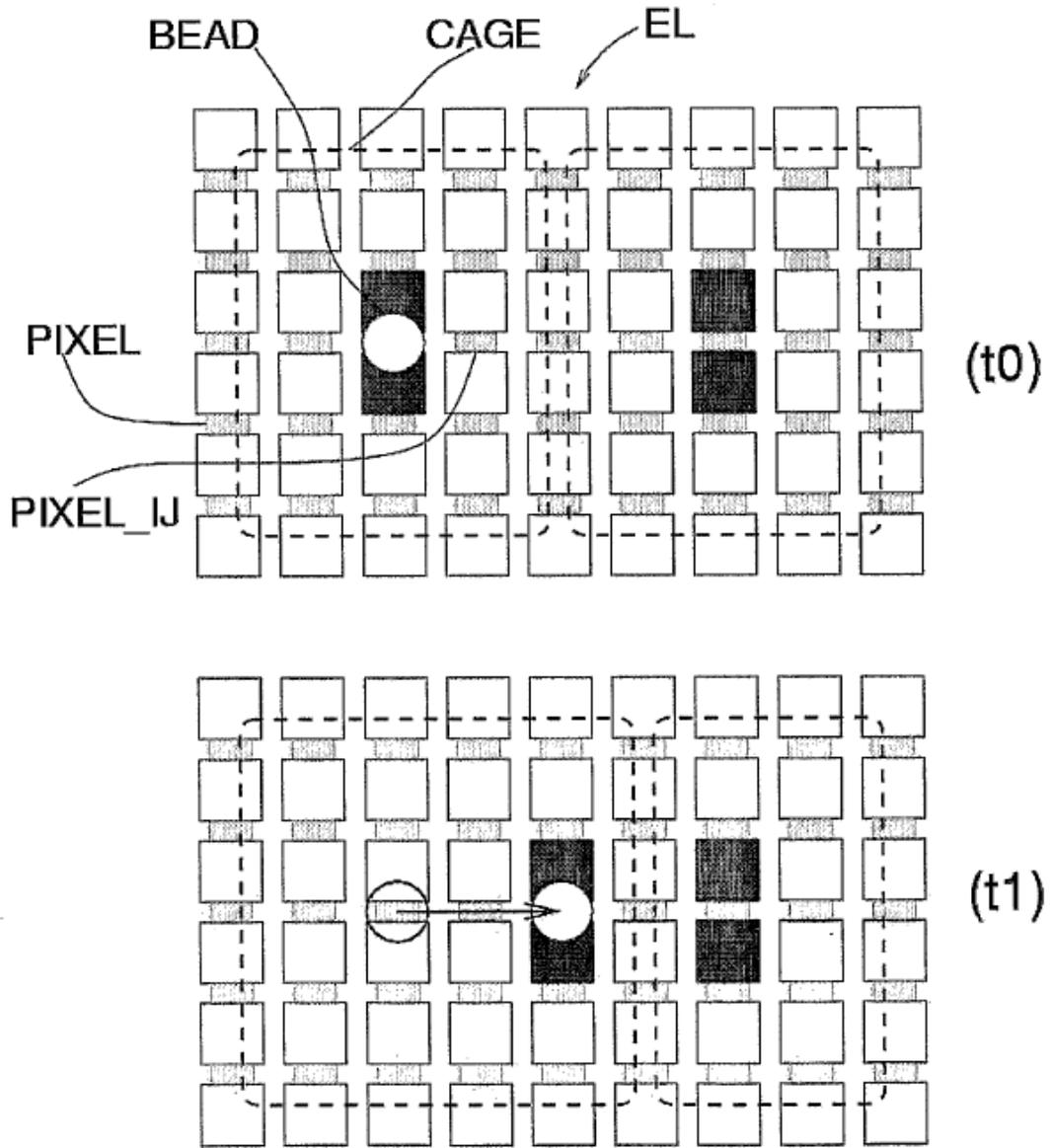


Fig. 14

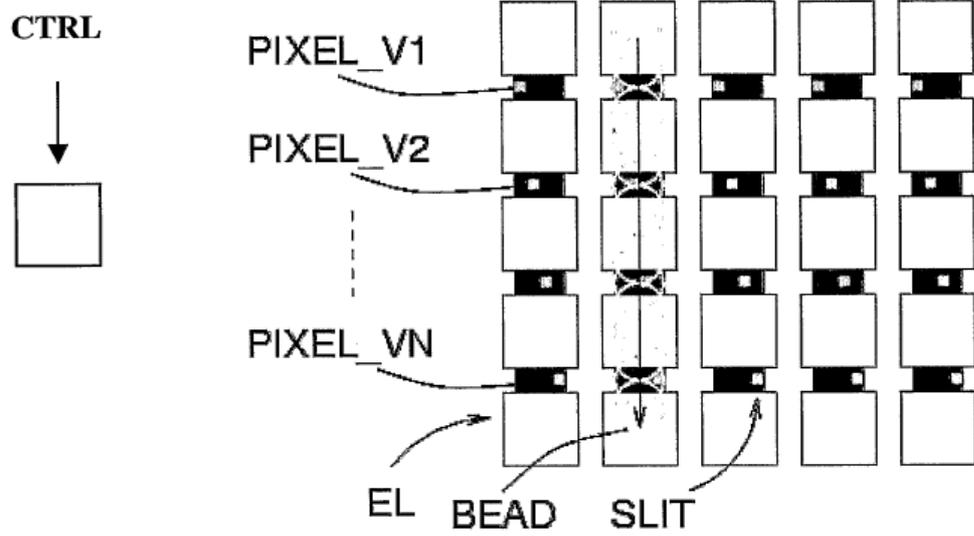


Fig. 15

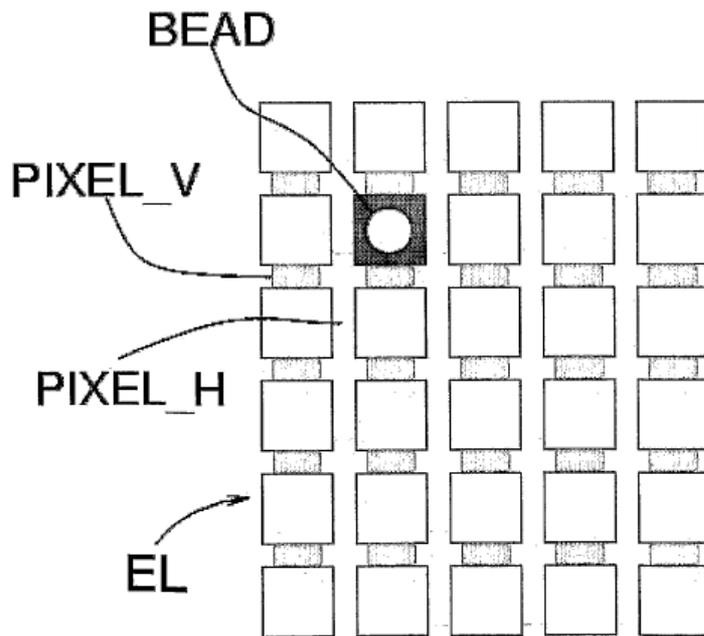


Fig. 16

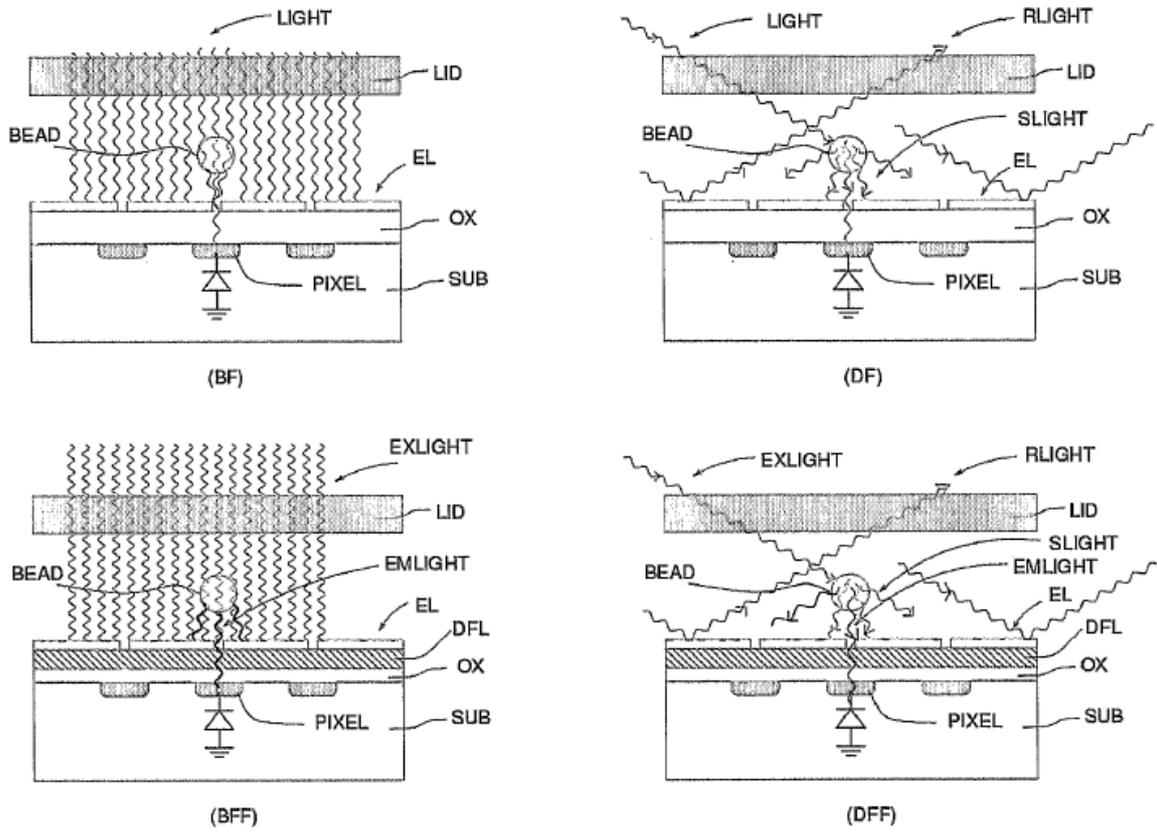


Fig. 17

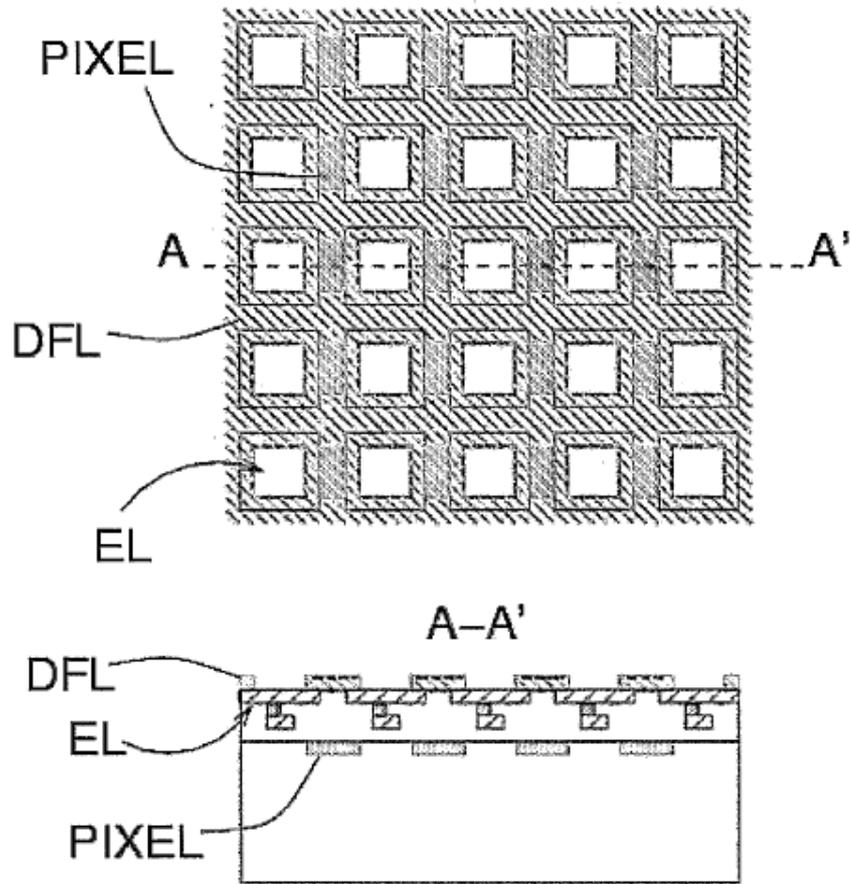


Fig. 18

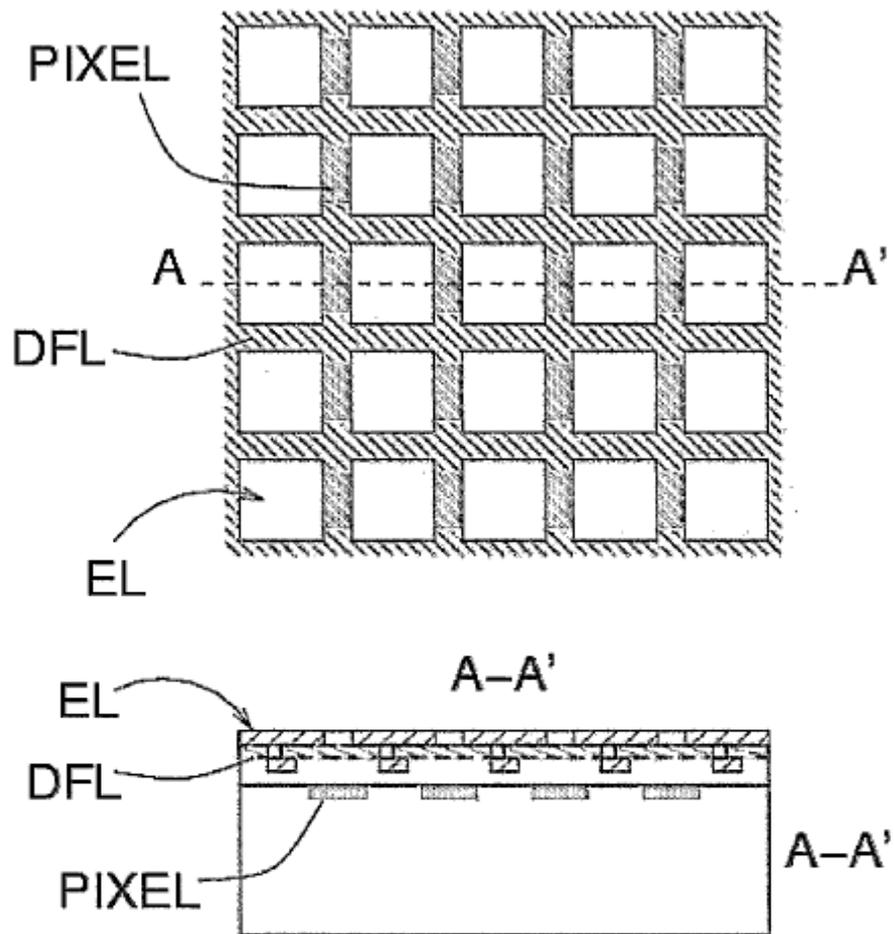


Fig. 19

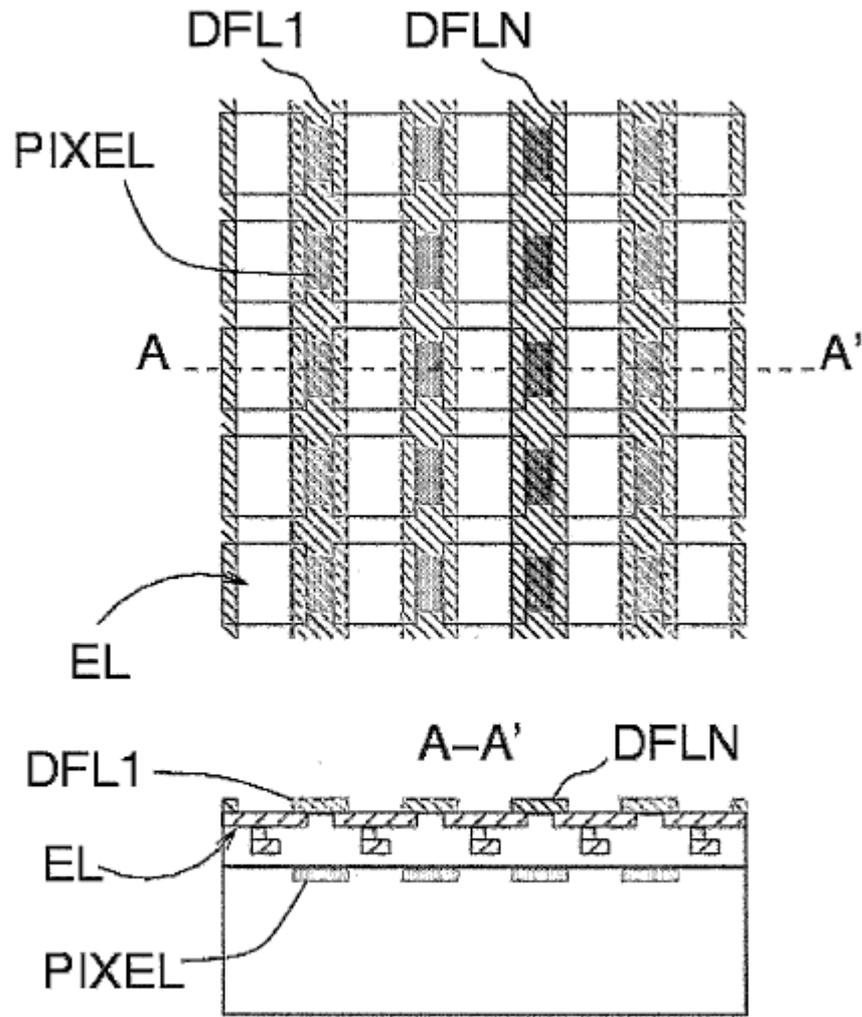


Fig. 20

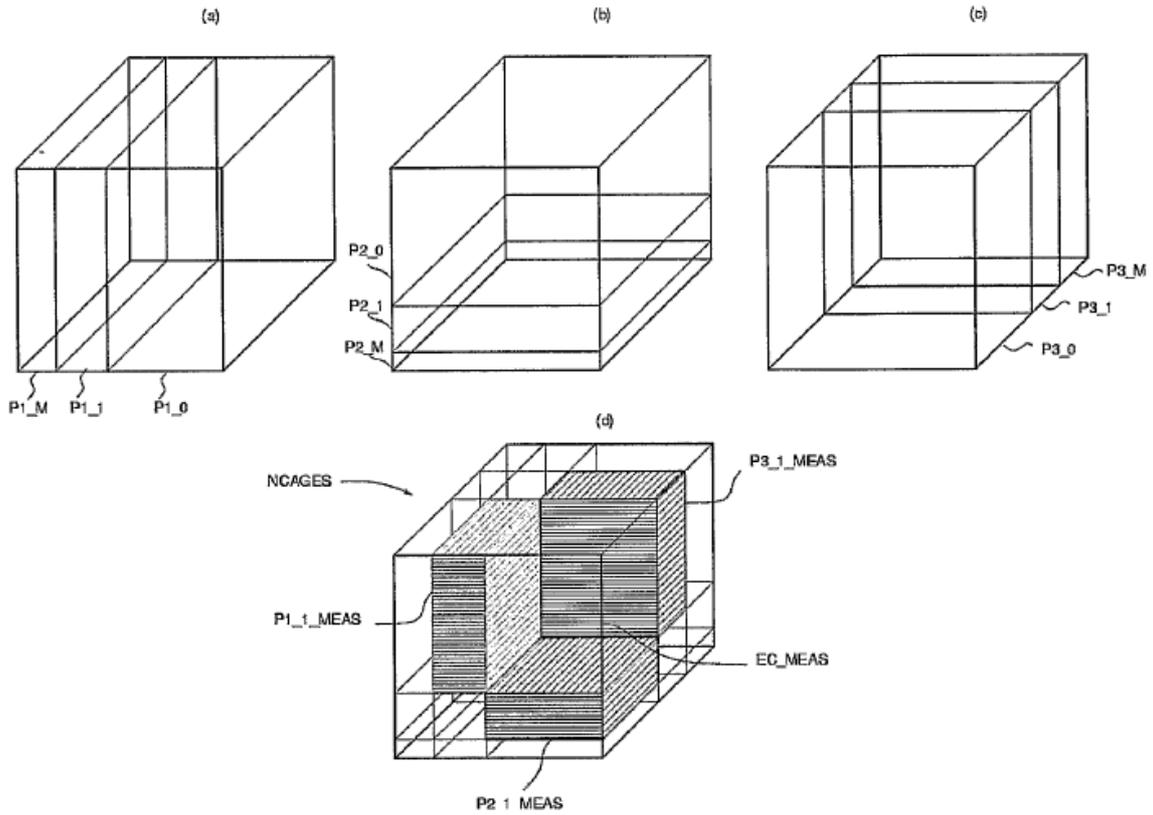


Fig. 21