

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 880 609**

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: **20.12.2013** **PCT/US2013/077183**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14143333**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013** **E 13877961 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.05.2021** **EP 2972839**

54 Título: **Métodos para detectar eventos de muestras coincidentes**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361785301 P

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

25.11.2021

73 Titular/es:

ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 Abbott Park Road, Dept. 377, AP6A-I
Abbott Park, Illinois 60064-6008, US

72 Inventor/es:

SHAH, AMISH

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 880 609 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

Métodos para detectar eventos de muestras coincidentes

5 Resumen

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para detectar eventos de muestras coincidentes como se reivindicó en la reivindicación 1. De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de citómetro de flujo como se reivindicó en la reivindicación 9.

10 Se describen métodos para detectar eventos de muestras coincidentes. Los métodos incluyen recibir un primer conjunto de datos de señales que representan señales detectadas de un sistema de citómetro de flujo; detectar, con un módulo de detección de picos, uno o más picos dentro de los datos de señales; y cancelar, con un módulo de cancelación sucesiva, uno o más eventos de muestras individuales de los datos de señales en los índices de tiempo correspondientes, en donde la cancelación de más de un evento de muestra individual es sucesiva.

15 Se describen sistemas de citómetro de flujo. Los sistemas de citómetro de flujo incluyen una celda de flujo para hacer fluir una corriente del núcleo enfocada hidrodinámicamente más allá de una zona de interrogación; óptica de conformación de rayo que se coloca para recibir y manipular un primer rayo de luz, y para producir un rayo de luz resultante que irradia la corriente del núcleo en la zona de interrogación de la celda de flujo; un sistema de detección para detectar la luz resultante de la celda de flujo cuando se irradia; y un sistema de procesamiento de datos que se acopla operativamente al sistema de detección para generar y procesar datos de señales que representan la luz resultante que se detecta por el sistema de detección. El procesamiento de los datos de señales incluye recibir un primer conjunto de datos de señales del sistema de detección; detectar uno o más picos dentro de los datos de señales; y cancelar uno o más eventos de muestras individuales de los datos de señales en los índices de tiempo correspondientes, en donde la cancelación de más de un evento de muestra individual es sucesiva.

20 Se describen medios legibles por máquina no transitorios. Los medios legibles por máquina tienen instrucciones ejecutables por máquina que se almacenan en ellos, que cuando se ejecutan por uno o más dispositivos de procesamiento, hacen que uno o más dispositivos de procesamiento reciban un primer conjunto de datos de señales que representan señales detectadas de un sistema de citómetro de flujo; detectar, con un módulo de detección de picos, uno o más picos dentro de los datos de señales; y cancelar, con un módulo de cancelación sucesiva, uno o más eventos de muestras individuales de los datos de señales en los índices de tiempo correspondientes, en donde la cancelación de más de un evento de muestra individual es sucesiva.

25 El documento US 2008/208511 A1 (Michael Trainer) describe un instrumento para medir la distribución de tamaño de una muestra de partículas al contar y clasificar partículas en intervalos de tamaño seleccionados. La concentración de partículas se reduce al nivel en el que la probabilidad de medir la dispersión de múltiples partículas al mismo tiempo se reduce a un nivel aceptable. Un rayo de luz se enfoca o colima a través de una celda de muestra, a través de la cual fluyen las partículas.

Breve descripción de las figuras

30 Los dibujos acompañantes, que se incorporan en la presente descripción, forman parte de la especificación. Junto con esta descripción escrita, los dibujos sirven además para explicar los principios y para permitir que una persona experta en la(s) técnica(s) relevante(s) fabrique y use los sistemas y métodos presentados. En los dibujos acompañantes, los cuales ilustran una o más modalidades ilustrativas, los números de referencia similares indican elementos idénticos o funcionalmente similares.

35 La Figura 1 ilustra una modalidad de un sistema de citómetro de flujo.

La Figura 2 ilustra una modalidad de un sistema de procesamiento de datos.

40 La Figura 3 ilustra una modalidad de un diagrama de flujo para detectar eventos de muestras coincidentes.

45 La Figura 4 ilustra una modalidad de un gráfico de una respuesta de salida combinada para un evento coincidente, junto con gráficos de los eventos de muestras individuales dentro del evento coincidente.

50 La Figura 5 ilustra una modalidad de un gráfico de ejemplo de asimetría.

55 La Figura 6 ilustra una modalidad de un gráfico de una respuesta combinada para un evento coincidente que tiene un solo pico, junto con gráficos de los eventos de muestras individuales dentro del evento coincidente.

60 La Figura 7 ilustra una modalidad de un gráfico de una respuesta combinada para un evento coincidente.

65

La Figura 8 ilustra una modalidad de un diagrama de bloques funcional de un módulo de restauración de la línea base, un módulo de detección de picos, un módulo de cancelación sucesiva y un módulo de análisis de canal que realiza el método de la Figura 3.

5 Descripción detallada

Antes de que se describan las modalidades de la presente descripción, debe entenderse que la presente descripción no se limita a las modalidades particulares descritas, ya que tales, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción tiene el propósito de describir modalidades particulares únicamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de las modalidades de la presente descripción se limitará únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos científicos y técnicos que se usan en la presente descripción tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por una persona experta en la técnica a la que pertenece esta invención.

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

En algunos aspectos, los métodos y sistemas de la presente descripción se relacionan con la detección de muestras en citómetros de flujo. La muestra específica puede variar en dependencia de la aplicación y puede incluir, pero no se limita a, células, partículas o sus combinaciones. Por ejemplo, en ciertas modalidades, la muestra puede incluir uno o más de los siguientes: glóbulos rojos (RBC), glóbulos blancos (WBC) y plaquetas (PLC). Los sistemas y métodos pueden relacionarse con varios tipos de procesamiento de las muestras, como la identificación de las muestras, la diferenciación de las muestras, el recuento de la muestra, etc.

El término "evento" se usa en la presente descripción para referirse generalmente a una o más muestras (por ejemplo, células y/o partículas) que pasan a través de la zona de interrogación de una celda de flujo y se irradian por una fuente de luz (por ejemplo, rayo láser). El evento genera una señal de luz resultante que se detecta por un sistema de detección. La señal de luz resultante puede incluir muchos parámetros detectados diferentes como, pero no se limita a, pérdida de luz axial, luz dispersa, fluorescencia, etc. Todos los parámetros conforman lo que en la presente descripción se denomina "perfil del evento".

El término "evento de señal", "evento de señal entrante", "datos de señal" se usan en la presente descripción para referirse generalmente a la energía resultante detectada cuando una o más muestras pasan a través de la zona de interrogación de una celda de flujo que se irradia por una fuente de luz (por ejemplo, rayo láser). El evento de señal puede incluir uno o más eventos de muestra. El término "evento de muestra" se usa en la presente descripción para referirse generalmente a la energía resultante de una sola muestra que pasa a través de la zona de interrogación y produce parámetros que componen el "perfil de evento de muestra" para ese evento de muestra.

En algunas modalidades, dos o más muestras pueden pasar a través de la zona de interrogación de la celda de flujo mientras son cercanos entre sí. El término "evento coincidente" y "evento de muestra coincidente" se usan en la presente descripción para referirse generalmente a la ocurrencia de dos muestras (por ejemplo, células, partículas, etc.) que pasan a través de la zona de interrogación mientras son cercanas entre sí. El "perfil de evento" resultante para la señal resultante tendrá solapamiento de "perfiles de eventos de muestras".

En algunos aspectos, los métodos y sistemas de la presente descripción se relacionan con la detección de eventos de muestra e identificación y resolución de eventos de muestras coincidentes, como los que ocurren dentro de una celda de flujo de un analizador de hematología, por ejemplo.

En algunos aspectos, los métodos y sistemas detectan alturas de pico precisas y perfiles de eventos de muestras (por ejemplo, área bajo el pulso, ancho de pulso y momentos de orden superior) durante eventos de muestras coincidentes. El sistema y los métodos que se proporcionan en la presente descripción permiten una detección más precisa de eventos de muestras coincidentes, como eventos de muestra cercanos entre sí y/o eventos de muestras más pequeños que están cerca de eventos de muestras más grandes. Al calcular alturas de pico precisas y perfiles de eventos de muestras dentro del evento coincidente, los ensayos pueden ejecutarse con concentraciones más altas (es decir, menos diluidas). Por ejemplo, es posible que ciertos ensayos en un analizador deban diluirse mucho para encontrar el recuento correcto de cada célula y/o partícula, así como también la relación entre los dos recuentos, por ejemplo, un ensayo Retic para encontrar la relación porcentual entre RBC y reticulocitos. La captura de eventos de muestra a una resolución más alta permite que pasen más eventos coincidentes a través de la celda de flujo y permite que los ensayos se ejecuten durante tiempos más cortos mientras se mantiene una alta precisión estadística y una mayor precisión de los parámetros de eventos de muestra, lo que aumenta efectivamente el rendimiento. Las muestras pueden procesarse a una velocidad más rápida, por ejemplo, 1,5 a 2 veces más rápido y

mayor. Los sistemas y métodos descritos en la presente descripción permiten una precisión con niveles de muestra concentrados más altos que los que resultan de la corrección estadística. Además, las muestras de mayor concentración consumen menos envoltura y usan menos desechos.

Como se resumió anteriormente, en algunos aspectos de la presente descripción, se proporcionan métodos para detectar eventos de muestras coincidentes. Los métodos incluyen recibir un primer conjunto de datos de señales que representan señales detectadas de un sistema de citómetro de flujo; detectar, con un módulo de detección de picos, uno o más picos dentro de los datos de señales; y cancelar, con un módulo de cancelación sucesiva, uno o más eventos de muestras individuales de los datos de señales en los índices de tiempo correspondientes, en donde la cancelación de más de un evento de muestra individual es sucesiva.

Como se resumió anteriormente, en algunos aspectos de la presente descripción, se proporcionan sistemas de citómetro de flujo. Los sistemas de citómetro de flujo incluyen una celda de flujo para hacer fluir una corriente del núcleo enfocada hidrodinámicamente más allá de una zona de interrogación; óptica de conformación de rayo que se coloca para recibir y manipular un primer rayo de luz, y para producir un rayo de luz resultante que irradia la corriente del núcleo en la zona de interrogación de la celda de flujo; un sistema de detección para detectar la luz resultante de la celda de flujo cuando se irradia; y un sistema de procesamiento de datos que se acopla operativamente al sistema de detección para generar y procesar datos de señales que representan la luz resultante que se detecta por el sistema de detección. El procesamiento de los datos de señales incluye recibir un primer conjunto de datos de señales del sistema de detección; detectar uno o más picos dentro de los datos de señales; y cancelar uno o más eventos de muestras individuales de los datos de señales en los índices de tiempo correspondientes, en donde la cancelación de más de un evento de muestra individual es sucesiva.

Como se resumió anteriormente, se describen medios legibles por máquina no transitorios. Los medios legibles por máquina tienen instrucciones ejecutables por máquina que se almacenan en ellos, que cuando se ejecutan por uno o más dispositivos de procesamiento, hacen que uno o más dispositivos de procesamiento reciban un primer conjunto de datos de señales que representan señales detectadas de un sistema de citómetro de flujo; detectar, con un módulo de detección de picos, uno o más picos dentro de los datos de señales; y cancelar, con un módulo de cancelación sucesiva, uno o más eventos de muestras individuales de los datos de señales en los índices de tiempo correspondientes, en donde la cancelación de más de un evento de muestra individual es sucesiva.

La siguiente descripción detallada de las figuras se refiere a los dibujos acompañantes que ilustran modalidades ilustrativas. Son posibles otras modalidades. Pueden realizarse modificaciones a las modalidades descritas en la presente descripción sin apartarse del alcance de la presente invención. Por lo tanto, la siguiente descripción detallada no intenta ser limitante.

La Figura 1 ilustra una vista superior de una modalidad de un sistema de citómetro de flujo. Se muestra el sistema de citómetro de flujo 100 que incluye la óptica de conformación del rayo 110, la celda de flujo 120, la fuente de luz 140, el sistema de detección 130 y el sistema de procesamiento de datos 140.

La fuente de luz 140 puede incluir, por ejemplo, un láser que se acopla a una fibra óptica para generar un rayo láser dirigido a la óptica de conformación del rayo 110 que se coloca entre la fuente de luz 140 y la celda de flujo 120. El rayo láser se manipula por la óptica de conformación del rayo 110 para proporcionar un rayo enfocado dirigido a una zona de interrogación de la celda de flujo 120. Una corriente del núcleo dentro de la celda de flujo 120 se irradia por el rayo enfocado a medida que fluye más allá de la zona de interrogación de la celda de flujo 120.

La celda de flujo 120 se coloca de manera que la luz de la óptica de conformación del rayo 110 se dirija a una zona de interrogación en la celda de flujo 120. La celda de flujo 120 incluye una corriente del núcleo que se dirige más allá de la zona de interrogación de la celda de flujo 120. De esta manera, la corriente del núcleo que fluye a través de la celda de flujo 120 se irradia por la luz enfocada a medida que pasa a través de la zona de interrogación. La corriente del núcleo puede incluir, por ejemplo, muestras (por ejemplo, partículas, células o sus combinaciones) que se enfocan hidrodinámicamente en una envoltura de fluido (por ejemplo, se inyectan en el centro de la envoltura de fluido) y se dirigen más allá de la zona de interrogación en la celda de flujo 102.

El sistema de detección 130 se coloca junto a la celda de flujo para detectar la luz emitida desde la celda de flujo. A medida que las muestras pasan por la zona de interrogación, las características de la luz resultantes, como la dispersión de la luz, la pérdida de luz, la fluorescencia, etc. Por ejemplo, el sistema de detección 130 puede incluir un tubo fotomultiplicador (PMT), fotodiodo (PD), etc., para detectar luz y convertirla en una señal eléctrica. El sistema de detección 130 puede incluir uno o más detectores para detectar la pérdida de luz axial, y/o uno o más detectores para medir la cantidad de luz dispersa resultante cuando la corriente del núcleo se irradia en la zona de interrogación. Por ejemplo, el sistema de detección 130 puede incluir uno o más detectores para detectar la dispersión de ángulo intermedio (IAS) y/o la dispersión directa. El sistema de detección 130 también puede incluir lentes y detectores para detectar luz fluorescente, dispersión lateral polarizada y/o dispersión lateral despolarizada. Además, uno o más detectores pueden colocarse en varias posiciones alrededor de la celda de flujo, por ejemplo, a 90 grados de la celda de flujo. El sistema de detección 130 también puede incluir otros componentes tales como

lentes, reflectores o espejos, etc., que no se muestran. Por ejemplo, el sistema de detección 130 puede incluir componentes como lentes, reflectores o espejos, etc.

Las características de la luz, resultantes de cada muestra interrogada (por ejemplo, partícula o célula), se detectan para generar las señales eléctricas correspondientes. El sistema de procesamiento de datos 140 se acopla operativamente al sistema de detección 130 y recibe las señales eléctricas correspondientes. Estas señales eléctricas se convierten de señales analógicas a señales digitales mediante un convertidor de analógico a digital (ADC), por ejemplo, para generar datos de señal a una velocidad de muestreo determinada para representar las señales eléctricas del sistema de detección 130. En ciertas modalidades, las señales eléctricas analógicas pueden pasar por una etapa de preamplificación antes de convertirse en señales digitales. El término "datos de la señal" se usa en la presente descripción para referirse generalmente a la señal digital que se genera a partir del muestreo de la señal analógica.

El sistema de procesamiento de datos 140 puede usar o procesar de cualquier otra manera los datos de la señal para determinar varios parámetros de los eventos de la muestra (por ejemplo, para las células y/o partículas de la muestra). Los ejemplos de parámetros de eventos de muestra que se determinan por el sistema de procesamiento de datos 140 pueden incluir, pero no se limitan a, magnitudes de la señal (por ejemplo, pulso de señal de un evento detectado), picos de señal y sus respectivas alturas, anchos de señal, áreas bajo la señal. En ciertas modalidades, el sistema de procesamiento de datos puede determinar uno o más parámetros de momentos de orden superior, por ejemplo, desviación estándar de la señal (por ejemplo, momento de segundo orden), asimetría de la señal (por ejemplo, momento de tercer orden) y curtosis de la señal (por ejemplo, momento de cuarto orden). También pueden encontrarse otros parámetros, como la Transformada de Fourier Discreta (DFT). Estos parámetros pueden usarse luego para análisis adicionales, por ejemplo, con fines de clasificación de células. El sistema de procesamiento de datos 140 usa uno o más de estos parámetros para identificar y resolver eventos coincidentes que ocurren dentro de la celda de flujo.

La Figura 2 ilustra un diagrama de bloques ilustrativo de un sistema de procesamiento de datos sobre el cual pueden implementarse las modalidades descritas. Las realizaciones de la presente invención pueden ponerse en práctica con diversas configuraciones de sistemas informáticos tales como dispositivos portátiles, sistemas de microprocesadores, electrónica de usuario programable o basada en microprocesadores, miniordenadores, ordenadores centrales y similares. Las realizaciones también pueden ponerse en práctica en entornos informáticos distribuidos, donde las tareas se realizan mediante dispositivos de procesamiento remoto que se conectan a través de una red inalámbrica o por cable. La Figura 2 muestra un ejemplo de un sistema de procesamiento de datos, tal como el sistema de procesamiento de datos 200, que puede usarse con las realizaciones presentes descritas. Tenga en cuenta que, aunque la Figura 2 ilustra varios componentes de un sistema de procesamiento de datos, no pretende representar ninguna arquitectura o forma particular de interconectar los componentes, ya que tales detalles no guardan relación con las técnicas descritas en la presente descripción. También se apreciará que también pueden usarse ordenadores en red y otros sistemas de procesamiento de datos que tengan menos componentes o quizás más componentes. El sistema de procesamiento de datos de la Figura 2 puede ser, por ejemplo, un ordenador personal (PC), estación de trabajo, tableta, teléfono inteligente u otro dispositivo inalámbrico portátil, o cualquier dispositivo que tenga una funcionalidad similar. Además, el término "sistema de procesamiento de datos" también puede abarcar circuitos programables que se programan o configuran por software y/o microprograma, o dentro de circuitos "cableados" de propósito especial, o una combinación de tales formas. Dichos circuitos de propósito especial (si los hay) pueden tener la forma de, por ejemplo, uno o más circuitos integrados específicos de la aplicación (ASICs), dispositivos lógicos programables (PLD), arreglos de compuertas programables en campo (FPGA), etc. Por ejemplo, el dispositivo de procesamiento de datos puede tener la forma de un FPGA que incluye varios módulos que se acoplan de manera operativa y comunicable entre sí. Por ejemplo, el FPGA puede incluir un módulo que funciona como dispositivo de procesamiento, un módulo que funciona como memoria, un módulo de restauración de la línea base, un módulo de detección de picos, un módulo de cancelación sucesiva, un módulo de análisis de canales, etc.

Para el ejemplo que se muestra en la Figura 2, el sistema de procesamiento de datos 201 incluye un bus de sistema 202 que se acopla a un microprocesador 203, una memoria de sólo lectura (ROM) 207, una memoria de acceso aleatorio volátil (RAM) 205, así como también otra memoria no volátil 206. En la modalidad que se ilustra, el microprocesador 203 se acopla a la memoria caché 204. El bus de sistema 202 puede adaptarse para interconectar estos diversos componentes juntos y también interconectar los componentes 203, 207, 205 y 206 a un controlador de pantalla y dispositivo de pantalla 208, y a dispositivos periféricos tales como dispositivos de entrada/salida ("E/S") 210. Los tipos de dispositivos de E/S pueden incluir teclados, módems, interfaces de red, impresoras, escáneres, cámaras de video u otros dispositivos bien conocidos en la técnica. En una modalidad, el dispositivo de E/S incluye una interfaz para recibir datos derivados del sistema de detección 130. En algunas modalidades, los datos de la señal recibidos ya se convierten en una señal digital y, en otras modalidades, la interfaz incluye un convertidor de analógico a digital para digitalizar la señal entrante en los datos de la señal que se van a procesar. En algunas modalidades, los dispositivos de E/S 210 pueden acoplarse al bus de sistema 202 a través de los controladores de E/S 209. En una modalidad, el controlador de E/S 209 incluye un adaptador de bus serie universal ("USB") para controlar periféricos USB u otro tipo de adaptador de bus.

La RAM 205 puede implementarse como RAM dinámica ("DRAM") que requiere energía continuamente para actualizar o mantener los datos en la memoria. La otra memoria no volátil 206 puede ser un disco duro magnético, unidad óptica magnética, unidad óptica, DVD RAM u otro tipo de sistema de memoria que mantiene los datos después de que se desconecta la energía del sistema. Aunque la Figura 2 muestra que la memoria no volátil 206 como un dispositivo local que se acopla con el resto de los componentes del sistema de procesamiento de datos, los expertos en la materia apreciarán que las técnicas descritas pueden usar una memoria no volátil remota del sistema, como un dispositivo de almacenamiento de red que se acopla con el sistema de procesamiento de datos a través de una interfaz de red como un módem o una interfaz Ethernet (que no se muestra).

El sistema de procesamiento de datos 140 recibe la señal detectada del sistema de detección 130. Si la señal detectada del sistema de detección 130 aún no se ha digitalizado, el sistema de procesamiento de datos 140 digitaliza la señal detectada, por ejemplo, con un convertidor de analógico a digital (ADC), para generar los datos de la señal para el procesamiento. La velocidad de muestreo del convertidor de analógico a digital puede variar en diferentes modalidades. En una modalidad, el convertidor de analógico a digital del sistema de procesamiento de datos digitaliza la señal entrante del sistema de detección (por ejemplo, un tubo fotomultiplicador (PMT), fotodiodo (PD), etc.) a 10 millones de muestras por segundo (MSPS).

Por ejemplo, cada muestra que pasa a través de la celda de flujo interactúa con el rayo láser y produce una salida de convolución de un perfil del rayo láser y un tamaño de muestra en la dirección del flujo. Esta señal de convolución se captura por el sistema de detección (por ejemplo, PMT o PD) y se digitaliza por el ADC. Esta salida digitalizada son los datos de la señal de entrada para los métodos descritos en la presente descripción.

Los métodos pueden incluir procesar los datos de la señal para encontrar la altura pico del evento, así como también detectar posibles eventos de muestras individuales dentro de los eventos coincidentes. También pueden determinarse otros parámetros, tales como el ancho del pulso, el área bajo la curva y otros momentos de orden superior que pueden calcularse una vez que la forma del pulso del perfil de célula individual se extrae del evento coincidente. Los métodos también pueden encontrar los picos del evento incluso bajo la condición de señal ruidosa, lo que evita detecciones falsas de ruido electrónico o de interferencia.

Una vez que se detecta un pico de un evento de muestra en los datos de la señal, se genera un perfil de evento de muestra del modelo a partir de un perfil del rayo almacenado previamente y la altura de pico detectada de ese evento de muestra. Si se detecta más de una altura de pico durante el proceso de detección, la energía de los eventos de muestras individuales se calcula en base a sus alturas de pico, y la energía del evento de muestra se resta sucesivamente de la respuesta de evento combinada en los índices de tiempo correspondientes de los picos. En una modalidad, la señal con el valor de pico máximo se resta primero de la respuesta de la señal combinada (coincidente). El algoritmo trabaja sucesivamente con la energía de la señal sobrante para detectar cualquier otro evento de muestra más pequeño dentro del evento coincidente hasta que la energía de la señal sobrante no disminuya por la cantidad de energía de la señal restada.

En una modalidad, el proceso de cancelación sucesivo también es iterativo en el sentido de que corrige una determinación de la altura de pico de un evento de muestra previamente detectado y cancelado. Por ejemplo, cuando los eventos de muestra son muy cercanos, la primera altura de pico más grande puede detectarse y cancelarse primero a partir de los datos de la señal. A continuación, se detecta la cancelación del segundo pico. Se detecta la altura del segundo pico y se cancela el segundo pico de los datos de la señal original. En base a la cancelación del segundo pico de los datos de la señal original, puede corregirse entonces la altura del primer pico. El proceso de cancelación sucesivo puede continuar al cancelar sucesivamente el segundo pico de los datos de señal restantes después de la cancelación del primer pico.

Cuando solo se detecta un evento pico, la asimetría (momento de tercer orden) puede calcularse para detectar si hay pequeños eventos de muestra que se desplazan en el rastro adelantado o retrasado de un evento de muestra más grande, por ejemplo, como se muestra en las Figuras 5 y 6. Por ejemplo, cuando se calcula una Asimetría de más de un umbral predeterminado (por ejemplo, $\pm 0,15$), se inicia una cancelación sucesiva para obtener las alturas de eventos de muestra y los perfiles de eventos de muestras correctos. En una modalidad, la cancelación sucesiva también es iterativa como se describió anteriormente de manera similar.

La Figura 3 ilustra un diagrama de flujo para un método de detección de eventos de muestras coincidentes, de acuerdo con una modalidad. El método 300 comienza realizando una restauración de la línea base para determinar la altura precisa de un evento de muestra (Xp). Por ejemplo, un módulo de restauración de la línea base puede recibir un conjunto de datos de la señal y realizar una restauración de la línea base. La restauración de la línea base proporciona una estimación más precisa al tener en cuenta las variaciones y fluctuaciones del sistema, como las causadas por la óptica láser, la electrónica, el ruido, la interferencia, las variaciones de temperatura, las radiaciones térmicas, la viscosidad del fluido, etc.

En el bloque 302, se obtiene un nuevo conjunto de datos de la señal, por ejemplo, de un convertidor de analógico a digital (ADC) que se acopla a un sistema de detección de un sistema de citómetro de flujo. Un valor de restauración de la línea base se calcula al tomar el valor medio de un conjunto previo de datos de la señal que caen por debajo

de un valor de umbral predeterminado, T, como se representa en los bloques 304, 306 y 308. Por ejemplo, en el bloque 306, el valor medio se calcula a partir de un período de tiempo de 15 microsegundos de datos de la señal que está por debajo del umbral predeterminado, T. Por ejemplo, el período de tiempo de 15 microsegundos proporciona aproximadamente 150 muestras a una velocidad de muestreo de 10 MHz. Se apreciará que el período de tiempo y la velocidad de muestreo pueden variar en diferentes modalidades. El valor medio calculado se usa como el valor de restauración de la línea base, o se usa como el valor de restauración de la línea base actualizado, como se representa en el bloque 308.

El valor umbral predeterminado representa un valor umbral para la indicación de que se han producido uno o más eventos de muestra. El valor umbral predeterminado puede definirse experimentalmente y puede variar para diferentes partículas o células que se implementen. El umbral para los glóbulos rojos (RBC) puede implementarse como, pero no se limita a, 1,25 % del intervalo dinámico completo, por ejemplo. El umbral para los glóbulos blancos (WBC) puede implementarse como, pero no se limita a, 6-7 % del intervalo dinámico completo, por ejemplo. El umbral para reticulocitos puede implementarse como, pero no se limita a, 2-3 % del intervalo dinámico completo, por ejemplo. Estos valores de ejemplo son ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes.

En el bloque 310, la restauración de la línea base se realiza al restar el valor actualizado de restauración de la línea base del bloque 308 (por ejemplo, el valor medio calculado del bloque 306) de los datos de la señal entrante, X(i), cuando los datos de la señal van por encima del valor umbral predeterminado, T, en los bloques 302 y 304. En la modalidad que se muestra, la velocidad de muestreo es de 10 millones de muestras por segundo (MSPS). En el bloque 312, los datos de la señal resultante después de restar el valor de restauración de la línea base se usan para un procesamiento adicional, como para la detección de picos y/o corrección de coincidencia. En algunas modalidades, los datos de la señal resultante pueden almacenarse en búfer o almacenarse en la memoria.

Una vez que se realiza la restauración de la línea base, un módulo de detección de picos detecta el pico del evento de señal. En el bloque 314, el módulo de detección de picos determina si se detectan eventos de muestra. En una modalidad, se detecta un evento de señal, que puede incluir uno o más eventos de muestra, cuando un pico del pulso de señal aumenta por encima del valor umbral predeterminado. También puede haber más de un evento de muestra, así como también más de un pico por encima del valor umbral. En consecuencia, el módulo de detección de picos identifica los picos del pulso de señal y detecta si están por encima del umbral predeterminado. En una modalidad, por ejemplo, los criterios de detección de eventos de señal pueden ser los siguientes:

$$X_p \geq T$$

$$X_p \geq X_{p+1} \geq T$$

$$X_p \geq X_{p-1} \geq T$$

$$X_p \geq X_{p+4}$$

$$X_p \geq X_{p-4}$$

$$X_p \geq X_{p+2} \geq T$$

$$X_p \geq X_{p-2} \geq T$$

$$X_p \geq X_{p+5}$$

$$X_p \geq X_{p-5}$$

$$X_p \geq X_{p+3} \geq T$$

$$X_p \geq X_{p-3} \geq T$$

$$X_p \geq X_{p+6}$$

$$X_p \geq X_{p-6}$$

donde T es un valor de umbral predeterminado o programable, y X_{p+n} es n^{ésima} muestra de X_p . Si los datos de la señal entrante satisfacen todas estas condiciones, entonces pueden registrarse alturas de pico únicas o múltiples del evento de señal.

En el bloque 316, el módulo de detección de picos determina si se detecta más de un pico dentro del evento de señal. Si se detectan múltiples alturas de pico dentro del evento de señal, entonces se determina que se detectan de cerca múltiples eventos de muestra durante el tiempo en que las muestras estaban por encima del valor umbral. Entonces puede ejecutarse un módulo de cancelación sucesiva para cancelar sucesivamente la energía de eventos de muestras individuales, como se representa por la flecha "Sí" del bloque 316 al bloque 320, por ejemplo, para restar sucesivamente la energía de un evento de muestra a la vez. En una modalidad, el proceso de cancelación también puede ser iterativo en el sentido de que una o más determinaciones previas de la altura de los picos de cancelaciones previas pueden corregirse en base a la cancelación de un pico sucesivo de los datos de la señal original.

Para medir la altura de pico precisa de cada evento de muestra individual dentro de la coincidencia, el módulo de cancelación sucesiva resta la energía para cada evento de muestra individualmente de los datos de la señal (por ejemplo, la señal de entrada combinada para los múltiples eventos de muestra). En una modalidad, los eventos de muestras más grandes se detectan y se restan primero uno a la vez, para permitir una detección más clara de eventos de muestras más pequeños dentro de los datos de la señal. Por ejemplo, los eventos de la muestra de glóbulos blancos pueden ser más grandes que los eventos de la muestra de glóbulos rojos y los eventos de las plaquetas, en cuyo caso los eventos de la muestra de glóbulos blancos se detectarían y restarían sucesivamente primero. La detección del pico preciso del pulso permite la detección y cancelación exitosas de la señal más fuerte (por ejemplo, WBC sin introducir ninguna energía residual que pueda causar un error, por ejemplo, al confundirse con un evento de muestra pequeña. De nuevo, el proceso de cancelación también puede ser iterativo en el sentido

de que una o más determinaciones de altura de pico previas de cancelaciones previas pueden corregirse en base a la cancelación de un pico sucesivo de los datos de la señal original.

En el bloque 318, se identifica el evento de muestra de pico más grande y el índice de tiempo correspondiente para el evento de muestra. A partir de la información de pico, puede generarse una forma de onda ideal de la señal gaussiana, por ejemplo, en base a un perfil del rayo almacenado o predeterminado y la altura del pico máximo encontrado, como se representa en el bloque 320.

En una modalidad, la señal de entrada combinada (por ejemplo, datos de la señal) se representa matemáticamente por la suma de las convoluciones del perfil del rayo láser y el tamaño de la muestra en la dirección del flujo, tal como se representa en la siguiente ecuación.

$$x(t) = \sum_{i=1}^N X_p * h(t) + n(t)$$

donde $x(t)$ es el conjunto de datos de señales entrantes; X_p tamaño de los eventos de muestras individuales en la dirección del flujo dentro del conjunto de datos de señales entrantes; $h(t)$ es el perfil del rayo láser; $*$ es el proceso de convolución; y $n(t)$ es la electrónica y/o el ruido de interferencia. Por lo tanto, una vez que el tamaño del evento de muestra en la dirección del flujo, X_p , se detecta, puede generarse un evento de muestra del modelo, que representa una señal convolucionada ideal, a partir del perfil del rayo láser guardado. Por ejemplo, en una modalidad, el evento de muestra del modelo (por ejemplo, la señal convolucionada ideal para ese evento de muestra) puede encontrarse a partir de la siguiente ecuación.

$$x_p' = X_p * h(t)$$

La energía del evento de muestra del modelo (por ejemplo, señal convolucionada ideal), x_p' , se resta luego en el índice de tiempo correcto de la energía de los datos de la señal, $x(t)$, como se representa en el bloque 322. Una ecuación de ejemplo de la energía de los datos de la señal puede representarse como sigue.

$$x(t) = x(t) - x_p'$$

En el bloque 324, se determina si la energía total de los datos de la señal se reduce por la energía generada de la celda del modelo (por ejemplo, la señal de muestra convolucionada ideal). En otras palabras, si queda energía restante cuando la energía del evento de muestra del modelo se resta de la energía de los datos de la señal.

Si queda energía sobrante significativa (por ejemplo, la energía de los datos de la señal se reduce por la energía del evento de muestra del modelo), entonces se ingresa nuevamente para la siguiente cancelación sucesiva para encontrar otro evento de muestra de tamaño equivalente o un evento de muestra más pequeño dentro de los datos de la señal (por ejemplo, señal combinada), como se representa mediante la flecha desde el bloque 324 hasta el bloque 318. Por ejemplo, en el bloque 318, el evento de muestra de pico más grande se detecta entonces para los datos de la señal restantes que quedan de la primera cancelación. En el bloque 320, se genera un segundo evento de muestra del modelo para este evento de muestra pico, y en el bloque 322, la energía del segundo evento de muestra del modelo se resta sucesivamente en el índice de tiempo correspondiente de los datos de muestra restantes que quedan de la primera cancelación. A continuación, en el bloque 324, se determina si la energía total de los datos de la señal se reduce después de la cancelación de la primera y segunda cancelación (por ejemplo, si queda energía sobrante después de la primera y segunda cancelación). En una modalidad en la que la cancelación es iterativa, el segundo evento de muestra del modelo generado se resta sucesivamente en el índice de tiempo correspondiente de los datos de la señal original y, en base a los resultados de esta resta, la primera altura de pico (determinada para el primer evento de muestra que se canceló) se corrige.

Se apreciará que la corrección iterativa puede ocurrir para una altura de pico previa que no es necesariamente la altura de pico inmediatamente anterior que se determinó y canceló. Por ejemplo, después de la cancelación de dos picos, puede usarse un tercer pico detectado para la cancelación para generar un tercer evento de muestra del modelo para el tercer pico, y la energía para el tercer evento de muestra del modelo puede restarse de los datos de la señal original para corregir la determinación de la altura del pico del primer pico y/o la altura del segundo pico.

Si la energía no disminuye (por ejemplo, si no hay energía sobrante o insignificante o despreciable), por ejemplo, como se representa en la siguiente ecuación, entonces puede determinarse que se detectaron todos los eventos de muestra dentro de ese evento coincidente.

$$x(t) - x_p' \geq x_p'$$

Si no queda energía sobrante (la energía total de la señal no se reduce), entonces se detectan todos los eventos de muestras individuales dentro de la señal entrante. Una vez que los picos individuales de la señal entrante se han identificado con el índice de tiempo correcto, es posible repetir los mismos cálculos para todos los canales. Cada canal puede representar, por ejemplo, la detección de varios datos, tales como, pero no se limita a, dispersión lateral, pérdida de luz axial, dispersión polarizada, dispersión despolarizada, fluorescencia, etc. Sin embargo, debido a que los eventos de muestras individuales ocurren al mismo tiempo, los índices de tiempo de cada pico individual pueden usarse para encontrar las características correspondientes en esos momentos en los otros canales. En algunas modalidades, puede usarse un intervalo de tiempo en base a los índices de tiempo, como dentro de un tiempo predeterminado antes y después de los índices de tiempo. Esto proporciona una forma alternativa de obtener la misma información de los otros canales, en lugar de realizar el mismo proceso en los otros canales, lo que puede consumir más energía y tiempo de procesamiento. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 3, los índices de tiempo para cada uno de los picos de eventos de muestras individuales pueden usarse para encontrar las características correspondientes en otros canales en esos momentos aproximados en que ocurren los eventos de muestra. Por ejemplo, en el bloque 330, un módulo de análisis de canal identifica las características correspondientes en los otros canales (por ejemplo, picos de eventos de muestra), al identificar un intervalo de tiempo en base a los índices de tiempo de los eventos de muestras individuales detectados por el módulo de cancelación sucesiva. Por ejemplo, en la modalidad que se muestra, el intervalo de tiempo es de +/- 0,5 microsegundos a partir de los índices de tiempo de los eventos de muestras individuales. Otras tolerancias o tamaños del intervalo de tiempo pueden variar en diferentes modalidades. De esta manera, los datos del perfil de eventos de muestra de todos los canales pueden recopilarse para cada evento de muestra, como se representa en el bloque 132.

La Figura 4 ilustra un gráfico de un conjunto de ejemplo de datos de la señal con una señal de salida combinada para múltiples eventos de muestra que son cercanos entre sí, de acuerdo con una modalidad. El gráfico 400 ilustra los datos de la señal 405 (por ejemplo, señal de salida combinada para múltiples eventos de muestra) que se recibe desde el convertidor de analógico a digital y que incluye múltiples picos. Por ejemplo, el eje horizontal muestra muestras que se toman a una velocidad de muestreo de 10 MHz. El eje vertical muestra el nivel de tensión asociado para cada muestra. Como se muestra, la señal de salida combinada 405 incluye un triplete de eventos de muestra 410, 415 y 420. La señal de salida combinada resultante 405 se muestra con tres picos 425, 430 y 435, que se producen a partir de la ocurrencia de eventos de muestra, 410, 415 y 420. El módulo de cancelación sucesiva descrito para la Figura 3, por ejemplo, extrae la energía para estos eventos de muestra sucesiva e iterativamente al cancelar primero la energía de la señal más fuerte.

De regreso a la Figura 3, si en el bloque 316, solo se encuentra una altura de pico dentro del evento de muestra, entonces se calcula la asimetría del pulso, como se representa en el bloque 326. La asimetría es un momento de tercer orden del pulso y puede usarse para determinar si un evento de muestra más pequeño está presente cerca de un evento de muestra más grande. En una modalidad, por ejemplo, la asimetría puede calcularse mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Inclinación} = \frac{n}{(n-1)(n-2)} \sum \left(\frac{x_i - \bar{x}}{s} \right)^2$$

Un umbral de asimetría predeterminado puede predeterminarse y usarse para indicar si un evento de muestra más pequeño está cerca de un evento de muestra más grande. Por ejemplo, si la asimetría calculada es mayor que el nivel de umbral predeterminado (por ejemplo, +/- 0,15), entonces puede determinarse que una célula más pequeña incluso está cerca de un evento de muestra más grande, y luego el módulo de cancelación sucesiva puede ejecutarse para restar el evento de muestra más grande, como se representa por la flecha desde bloque 328 al bloque 318. Si la asimetría calculada es menor que el nivel de umbral predeterminado, entonces se determina que no está presente ningún evento de muestra más pequeño, y al bloque 330 donde se identifica el máximo local de la amplitud máxima dentro de un intervalo (por ejemplo, +/- 0,5 microsegundos) para otros canales de datos para todos los picos encontrados en la ventana. De esta manera, pueden recopilarse datos de eventos de muestra de todos los canales para el evento de muestra, como se representa en el bloque 332.

La Figura 5 ilustra un ejemplo de una distribución sesgada positivamente 510 y una distribución sesgada negativamente 520. Un valor de asimetría positivo o negativo indica que un pulso tiene un rastro adelantado o retrasado. El rastro adelantado y retrasado es causado por células más pequeñas que pasan muy cerca de una célula más grande. Una vez que se resta la respuesta de evento de muestra más grande de acuerdo con el algoritmo de cancelación sucesiva descrito anteriormente de la respuesta combinada, pueden calcularse la altura de pico precisa, así como también los momentos de orden superior para el evento de muestra más pequeño.

La Figura 6 ilustra un ejemplo de salida combinada de un evento de muestra grande muy cerca de un evento de muestra más pequeño. Como se muestra, el gráfico 600 ilustra los datos de la señal 610 (por ejemplo, la señal de salida combinada para los múltiples eventos de muestra) que se reciben desde el convertidor de analógico a digital. Por ejemplo, el eje horizontal muestra muestras que se toman a una velocidad de muestreo de 10 MHz. El eje

vertical muestra el nivel de tensión asociado para cada muestra. Como se muestra, la señal de salida combinada 610 incluye un evento de muestra grande 615 (por ejemplo, de un glóbulo rojo, RBC) y un evento de muestra más pequeño 620 (por ejemplo, de una plaqueta más pequeña, PLT). La señal de salida combinada resultante 610 es un evento más grande que está sesgado en el rastro atrasado (a la derecha). Además, una vez que la señal más fuerte (es decir, el evento de muestra más grande) se cancela en el desplazamiento correcto (por ejemplo, índice de tiempo), la señal más débil (es decir, el evento de muestra más pequeño) es fácilmente detectable.

La Figura 7 ilustra un ejemplo de señal de salida combinada 710 cuando un evento de muestra más pequeño (por ejemplo, plaquetas) está entre dos eventos de muestra grandes (por ejemplo, glóbulos rojos) y en el hombro del primer evento de muestra grande. Los picos grandes 715 y 725 indican los eventos de muestras más grandes (por ejemplo, debido a los glóbulos rojos), y la asimetría vista en 720 indica que está presente un evento de muestra pequeño (por ejemplo, plaquetas).

La Figura 8 ilustra un diagrama de bloques funcional de un módulo de restauración de la línea base, un módulo de detección de picos, un módulo de cancelación sucesiva y un módulo de análisis de canal que realiza el método que se muestra en la Figura 3, de acuerdo con una modalidad. El módulo de restauración de la línea base 820, el módulo de detección de picos 830, el módulo de cancelación sucesiva 840 y el módulo de análisis de canal 850 se muestran dentro de la memoria 810 y pueden ejecutarse por un dispositivo de procesamiento (por ejemplo, procesador, microprocesador, circuitos integrados específicos de la aplicación (ASICs), dispositivos lógicos programables (PLD), matrices de compuertas programables en campo (FPGA), etc.) para realizar las funciones que se identifican en el método descrito en la Figura 3. La memoria 810 puede incluir, por ejemplo, una memoria incorporada o no incorporada, así como también una memoria volátil o no volátil. Por ejemplo, la memoria 801 puede incluir la memoria 206, la RAM volátil 205, la ROM 207, como se muestra en la Figura 2; o puede integrarse en un ASIC o FPGA, etc.; o también puede incluir, pero no se limita a, medios legibles por máquina no transitorios, como se describe a continuación. El término dispositivo de procesamiento se usa ampliamente en la presente descripción y puede referirse a uno o más procesadores, microprocesadores, circuitos integrados específicos de la aplicación (ASICs), dispositivos lógicos programables (PLD), arreglos de compuertas programables en campo (FPGA), etc., y/o cualquier otro dispositivo de procesamiento.

Otras modalidades y modificaciones dentro del alcance de la presente descripción serán evidentes para los expertos en la técnica relevante. Varias modificaciones, procesos, así como también numerosas estructuras a las que pueden aplicarse las modalidades de la presente descripción, serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica a los que se dirige la presente descripción tras la revisión de la especificación. Varios aspectos y características de la presente descripción pueden haberse explicado o descrito en relación con entendimientos, creencias, teorías, suposiciones subyacentes y/o ejemplos prácticos o proféticos, aunque se debe entender que la presente descripción no se vincula a ningún entendimiento en particular, creencia, teoría, suposición subyacente y/o ejemplo funcional o profético.

Debe entenderse que algunas de las técnicas introducidas anteriormente pueden implementarse mediante circuitos programables que se programan o configuran por software y/o microprograma, o pueden implementarse de manera completa mediante circuitos "cableados" de propósito especial, o en una combinación de tales formas. Dichos circuitos de propósito especial (si los hay) pueden tener la forma de, por ejemplo, uno o más circuitos integrados específicos de la aplicación (ASICs), dispositivos lógicos programables (PLD), arreglos de compuertas programables en campo (FPGA), etc.

El software o microprograma que implementa las técnicas que se introducen en la presente descripción puede almacenarse en un medio de almacenamiento legible por máquina y puede ejecutarse por uno o más microprocesadores programables de propósito general o de propósito especial. Un "medio legible por máquina", como se usa el término en la presente descripción, incluye cualquier mecanismo que pueda almacenar información en una forma accesible por una máquina (una máquina puede ser, por ejemplo, un ordenador, dispositivo de red, teléfono celular, asistente digital personal (PDA), herramienta de fabricación, cualquier dispositivo con uno o más procesadores, etc.). Por ejemplo, un medio accesible por máquina incluye medios grabables/no grabables (por ejemplo, memoria de solo lectura (ROM); memoria de acceso aleatorio (RAM); medios de almacenamiento en disco magnético; medios de almacenamiento ópticos; dispositivos de memoria flash; etc.), etc.

Los anteriores ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa de cómo hacer y usar las realizaciones de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni están destinados a representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de cualquier otra manera, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar eventos de muestras coincidentes, que comprende:
 - 5 recibir un primer conjunto de datos de señales dependientes del tiempo que representan señales detectadas de un sistema de citómetro de flujo (100);
detectar, con un módulo de detección de picos (830), uno o más picos dentro de los datos de la señal; caracterizado porque el método comprende
cancelar, con un módulo de cancelación sucesiva (840), uno o más eventos de muestras individuales de los
10 datos de la señal en los índices de tiempo correspondientes, en donde la cancelación de más de un evento de muestra individual es sucesiva,

y en donde la cancelación comprende:

15 detectar un primer evento pico y un primer índice de tiempo correspondiente para el primer evento pico;
generar un evento de muestra del modelo en base a un perfil del rayo almacenado y la altura del primer evento pico; y
restar la energía para el evento de muestra del modelo de la energía de los datos de la señal en el primer índice de tiempo correspondiente,
20 en donde la presencia de energía después de la resta indica la presencia de eventos de muestras coincidentes.
 2. El método de la reivindicación 1, en donde se detectan múltiples picos dentro de los datos de la señal, y en donde cuando la energía de los datos de la señal disminuye por la energía del evento de muestra del modelo, las etapas de la reivindicación 1 se repiten sucesivamente para eventos picos sucesivos e índices de tiempo correspondientes.
 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la energía para los eventos de muestras más grandes se resta primero de la energía de los datos de la señal.
 - 30 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cancelación sucesiva de más de un evento de muestra individual también es iterativa, en donde la cancelación iterativa corrige una determinación de pico de un evento de muestra previamente detectado y cancelado.
 - 35 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde solo se detecta un pico dentro de los datos de la señal, y en donde el método comprende:

calcular, con un módulo de detección de asimetría, una asimetría del pico de los datos de la señal para determinar si un evento de muestra más pequeño está cerca de un evento de muestra más grande.
40
 6. El método de la reivindicación 5, que comprende además:

detectar, con el módulo de detección de asimetría, una asimetría que indica que un evento de muestra más pequeño está cerca de un evento de muestra más grande;
45 en donde el evento de muestra del modelo representa el evento de muestra más grande, y en donde la energía del evento de muestra más grande se resta de la energía de los datos de la señal en el primer índice de tiempo correspondiente; y
en donde una altura de pico y momentos de orden superior para el evento de muestra más pequeño se calculan después de restar la energía del evento de muestra del modelo de la energía de los datos de la señal en el primer índice de tiempo correspondiente.
50
 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además:

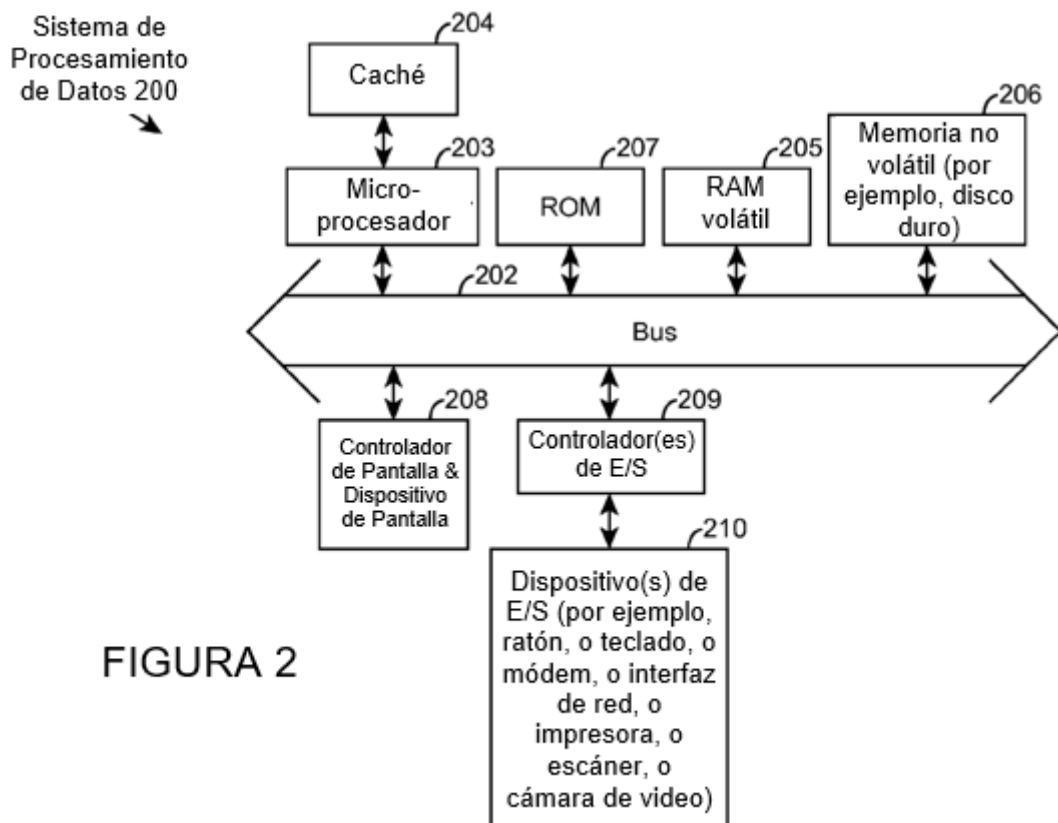
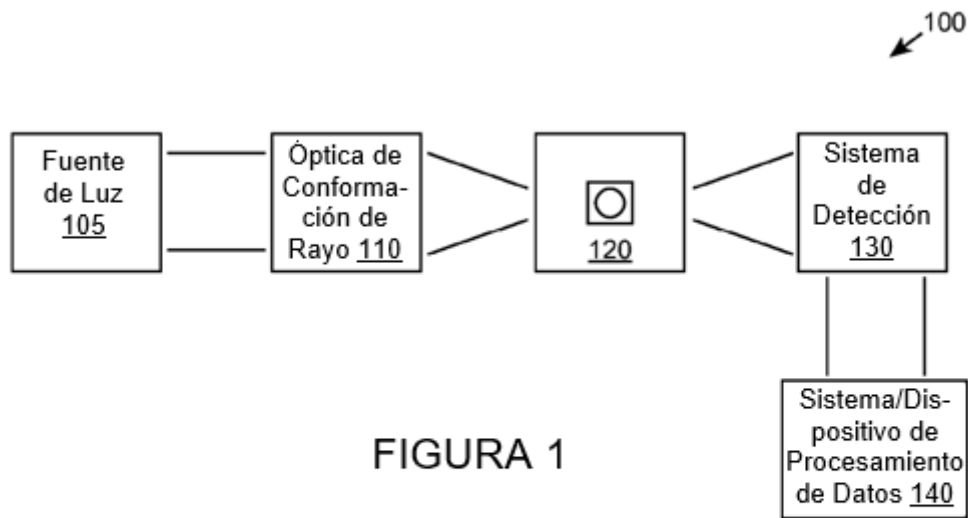
realizar, con un módulo de restauración de la línea base, una restauración de la línea base para los datos de la señal recibida antes de detectar uno o más picos, en donde la restauración de la línea base incluye:
55 calcular un valor de restauración de la línea base en base a un valor medio de un conjunto anterior de datos de la señal; y
restar el valor de restauración de la línea base de los datos de la señal recibida cuando los datos de la señal recibida son mayores que un valor umbral predeterminado.
60
 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además:
identificar, con un módulo de análisis de canal, características de uno o más canales de datos de señal dentro de una ventana de tiempo predeterminada para cada uno del uno o más picos detectados.
65
 9. Un sistema de citómetro de flujo (100), que comprende:

una celda de flujo (120) para hacer fluir una corriente del núcleo enfocada hidrodinámicamente más allá de una zona de interrogación;

5 óptica de conformación de rayo (110) que se coloca para recibir y manipular un primer rayo de luz, y para producir un rayo de luz resultante que irradia la corriente del núcleo en la zona de interrogación de la celda de flujo;

un sistema de detección (130) para detectar la luz resultante de la celda de flujo cuando se irradia; y

10 un sistema de procesamiento de datos (140) que se acopla operativamente al sistema de detección para generar y procesar datos de señales que representan la luz resultante detectada por el sistema de detección, en donde el sistema de procesamiento de datos se configura para realizar las etapas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.



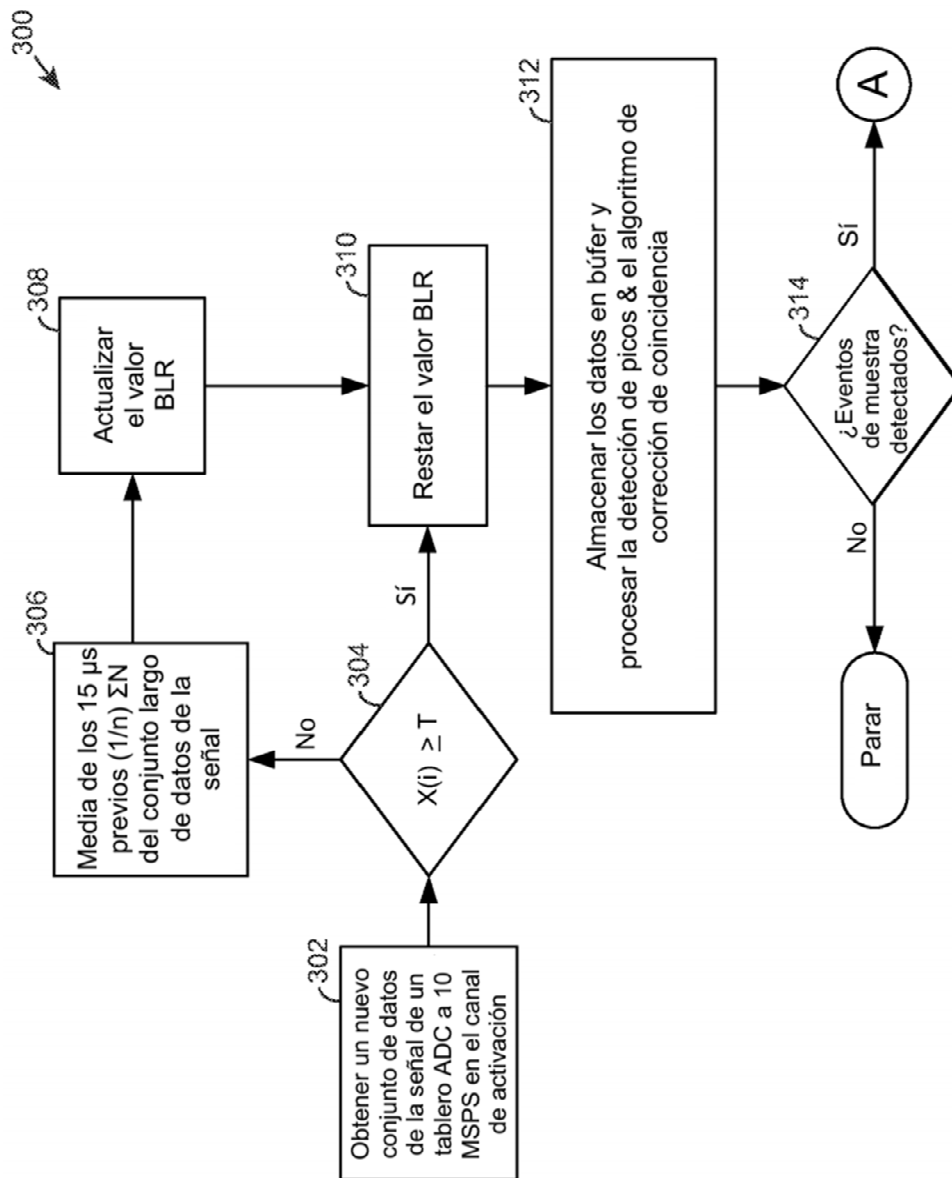


FIGURA 3

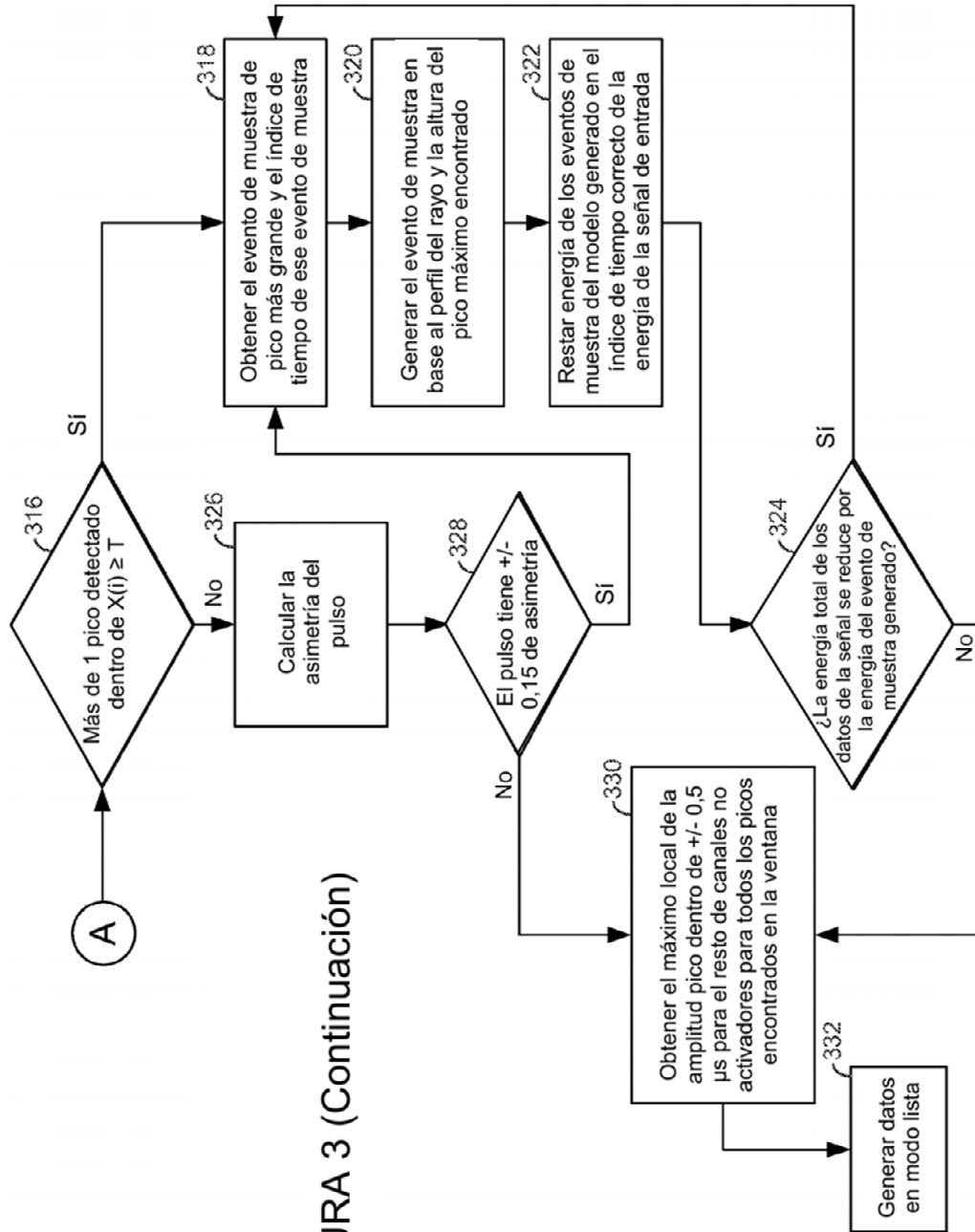


FIGURA 3 (Continuación)

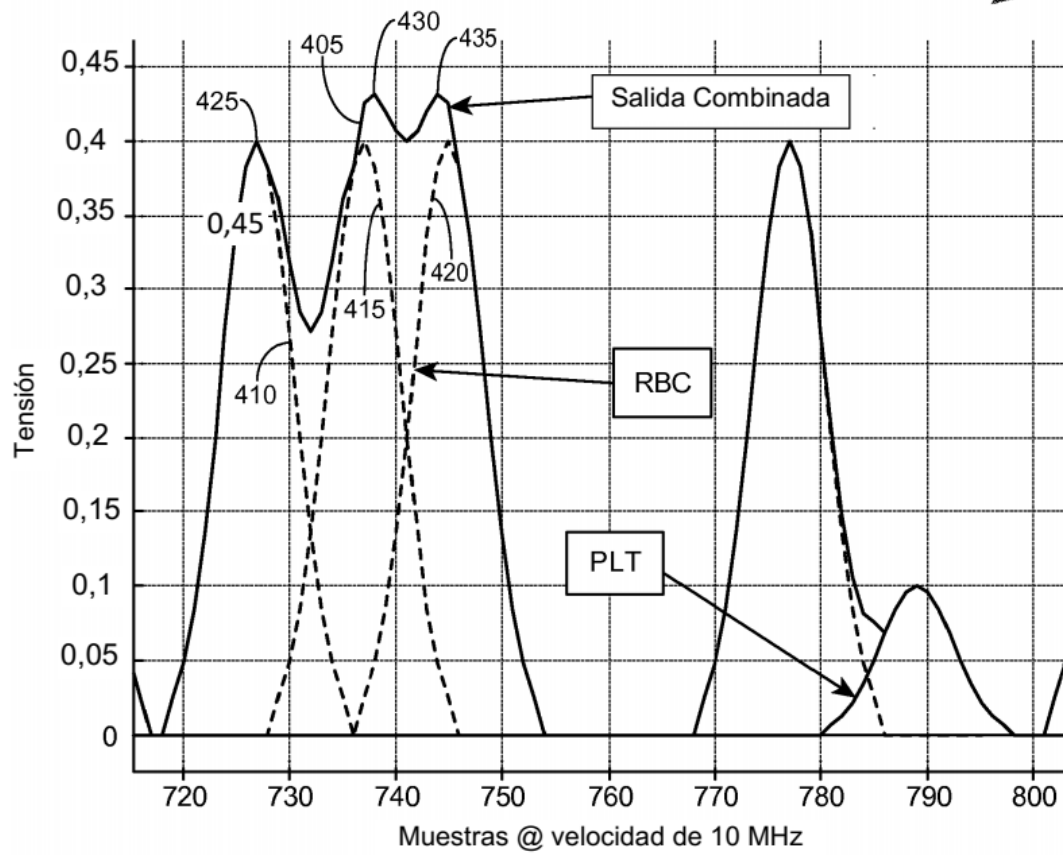


FIGURA 4

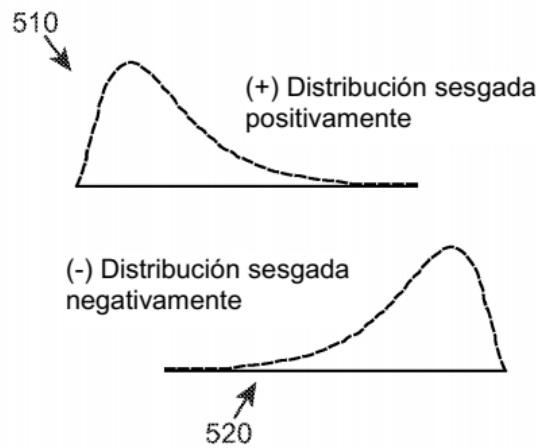


FIGURA 5

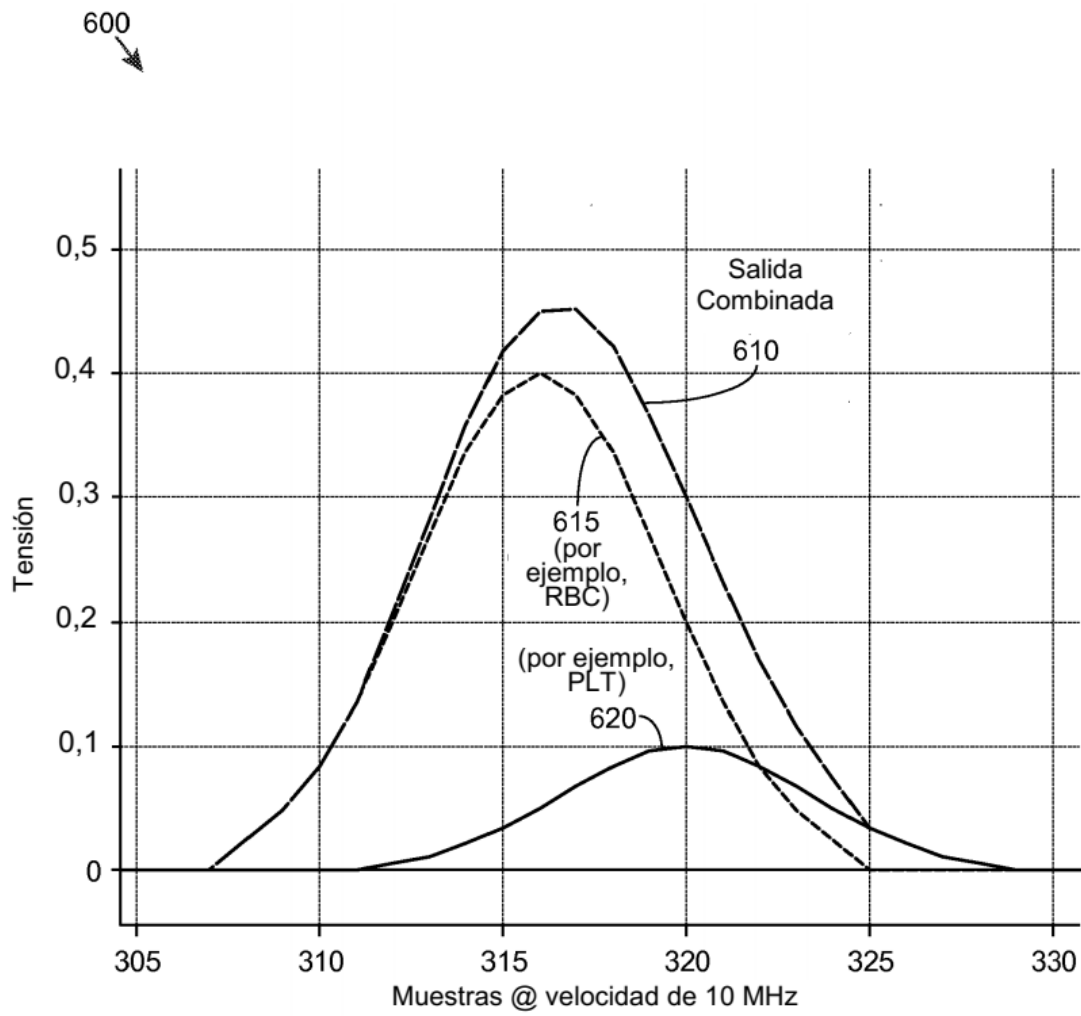


FIGURA 6

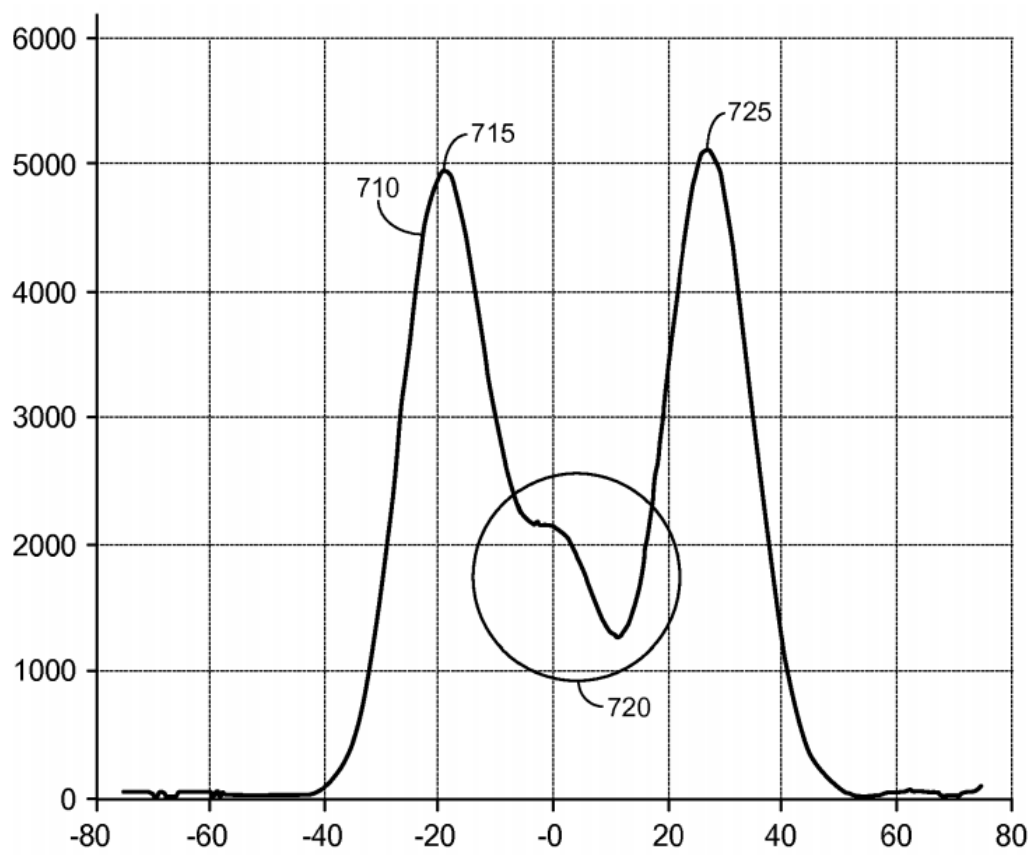


FIGURA 7

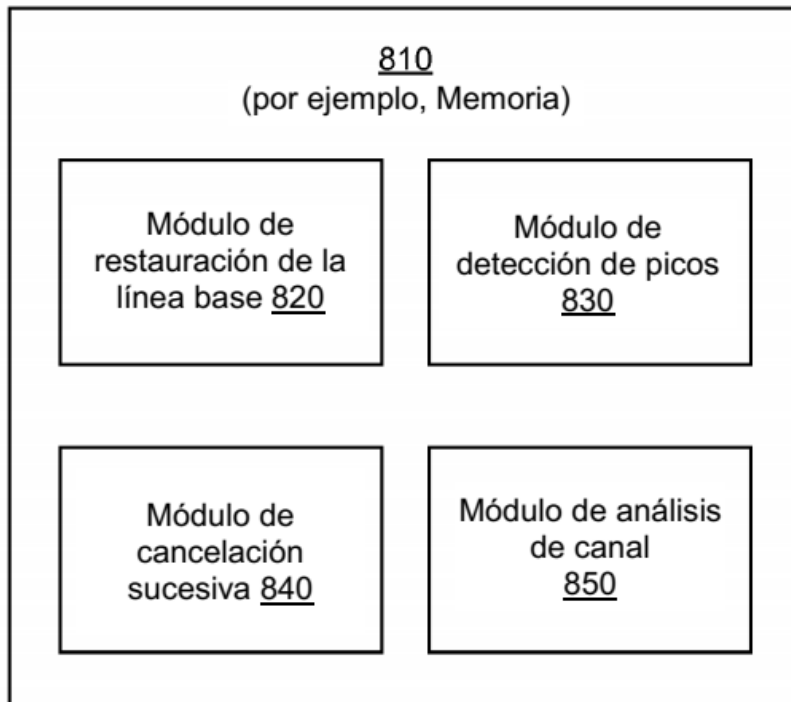


FIGURA 8