

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 391**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2008** **PCT/IB2008/002873**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2009** **WO09056941**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2008** **E 08844732 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.04.2021** **EP 2210081**

54 Título: **Método de identificación y manipulación de partículas**

30 Prioridad:

29.10.2007 IT TO20070771

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

22.11.2021

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:

MEDORO, GIANNI;
MANARESI, NICOLÒ y
GIANNI, STEFANO

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 879 391 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 de identificación y manipulación de partículas

Campo de aplicación

5 La presente invención se refiere a métodos miniaturizados para el manejo de células. En particular, la invención se refiere a métodos para optimizar la selección y el aislamiento, dentro de una población más o menos numerosa, de elementos de interés y/o utilidad para una serie de operaciones posteriores.

La invención se aplica principalmente en la implementación de protocolos biológicos sobre muestras de células en un volumen reducido de un medio de suspensión, que requieren un control preciso de células o partículas individuales para realizar la manipulación de dichas células o partículas.

10 Estado de la técnica

Existen numerosos protocolos experimentales que requieren una selección precisa y cuidadosa de partículas que tienen características específicas dentro de una población que constituye la muestra. La posibilidad de identificar, con base en los valores asumidos por al menos un parámetro de interés, las partículas de la población que cumplen determinados criterios y que, por lo tanto, son aptas para pasar con éxito las siguientes fases del protocolo experimental es crucial, no solo en acelerar y, por lo tanto, en general, reducir los costes de la campaña experimental, sino también y sobre todo cuando las células de interés son raras dentro de la población.

Se conocen protocolos experimentales de diagnóstico, entre otros, con base en el manejo de células (o, más generalmente, partículas) cuya concentración, dentro de la muestra, es particularmente baja y en los que, por lo tanto, se deben identificar y aislar las células de interés con base en sus características distintivas con una sensibilidad extremadamente alta, para no correr el riesgo de perder células/partículas de interés.

Por ejemplo, el documento EP0500727 (Bianchi) describe un protocolo experimental para el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas con base en la obtención, a partir de una muestra de sangre materna periférica, de una población enriquecida en células fetales nucleadas (eritroblastos) que luego se someten a una serie de procedimientos de diagnóstico de tipo genético (por ejemplo, FISH, QF-PCR, etc.).

25 El documento WO2006018849 [MonaLiza Medical] describe la posibilidad de realizar procedimientos de diagnóstico de tipo genético análogos en trofoblastos fetales obtenidos mediante el enriquecimiento apropiado de una muestra transcervical materna (TCC).

En ambos casos, de acuerdo con el protocolo experimental conocido, es necesario identificar qué células están nucleadas para poder proceder posteriormente al análisis de la herencia cromosómica. Además, es fundamental discriminar entre células fetales y células maternas, para evitar falsos positivos/negativos. También puede ser necesario realizar controles adicionales, destinados a excluir la posibilidad de falsos positivos.

Por lo tanto, en general, para uno o más parámetros característicos de las células/partículas de interés detectables mediante uno o más sensores correspondientes, se establece un valor umbral a partir del cual se realiza la selección.

Por ejemplo, el documento US20060139638 divulga un método para identificar y seleccionar mediante dielectroforesis células vivas de interés dentro de una población celular que también comprende células muertas o grupos de células. La selección se realiza tras el procesamiento de la distribución de luminosidad dentro de una celda que permite obtener algunos parámetros característicos de la celda, por ejemplo, la dimensión. Solo se seleccionan las celdas que tienen una dimensión por debajo de cierto valor, ya que se consideran de interés. Sin embargo, de esta manera, dado que el valor del parámetro de dimensión se establece antes del examen de las partículas de interés, a menudo solo se aísla realmente una fracción muy pequeña de las células/partículas de la población. Incluso es posible que ninguna de las células de interés sea seleccionada para las siguientes fases del protocolo (sin llamada). Sin embargo, esto no siempre implica que ninguna de las células de la población sea realmente utilizable. Dada la significativa variabilidad de la distribución de las características de interés en la población celular de un sujeto a otro, de un muestreo a otro, o incluso más simplemente por posibles alteraciones en las condiciones experimentales e instrumentales, el valor umbral preestablecido puede ser tan alto que el procedimiento de selección lleve al aislamiento de muy pocas células útiles para completar con éxito los análisis posteriores. Por otro lado, si el valor umbral es demasiado bajo o si, por ejemplo, la distribución de los valores del parámetro de interés dentro de la población celular es multimodal, el procedimiento de selección puede no ser lo suficientemente preciso (es decir, las células no útiles se seleccionan también), o puede privilegiar una porción de la muestra que no es representativa de toda la población celular.

50 La Figura 11 muestra la selección de partículas determinadas dentro de una población de partículas como en la técnica conocida, es decir, usando un valor umbral determinado a priori, es decir, antes del examen de la muestra completa.

Si el valor umbral preestablecido es demasiado bajo como en la Figura 11 (A), también se seleccionan células no útiles, es decir, las partículas seleccionadas están contaminadas. Por otro lado, si el valor umbral preestablecido es

alto como se muestra en la Figura 11 (B), el procedimiento de selección conduce al aislamiento de un número reducido de células útiles.

En consecuencia, las pruebas deben repetirse con frecuencia, deben tomarse nuevas muestras o, más simplemente, se desperdicia parte de una muestra útil, con la consiguiente pérdida de información.

- 5 En algunos casos se realiza una valoración a priori de las propiedades de la muestra, examinando una porción de la misma. Con base en la información recopilada en esta fase, se establecen valores umbral para los parámetros de interés y, posteriormente, se realiza la selección real sobre lo que queda de la muestra. Este método es desventajoso, en primer lugar, porque implica sacrificar una parte de la muestra para la evaluación preliminar y, en segundo lugar, porque los valores umbral preestablecidos ya no se pueden adaptar si la parte de la muestra examinada a priori resulta
- 10 no ser representativa de las características de toda la muestra.

Como se sabe, también existen diversas técnicas para la manipulación de partículas dentro de dispositivos microfluídicos.

Un método usa jaulas de potencial de dielectroforesis mientras que otros métodos implican el uso de microdissección láser o pinzas ópticas.

- 15 El inconveniente de la manipulación por microdissección láser es que las partes de interés (células individuales o grupos, etc.) se manipulan diseccionando la muestra junto con el soporte al que se adhiere. Además, la fase de microdissección láser no se puede aplicar a células o partículas sumergidas en un fluido.

Otro método conocido es colocar cuerpos dentro de fluidos y manipularlos por medios ópticos. Con pinzas láser es posible mantener las partículas en solución con gran precisión y moverlas de forma predeterminada.

- 20 Este tipo de manipulación tiene inconvenientes, sin embargo, debido a que la partícula dentro del haz de láser que lo atrapa está sujeta a colisiones térmicas y por lo tanto su posición puede modificarse accidentalmente al azar. Además, solo se puede mover una partícula a la vez y no se puede controlar la posición de cada partícula de una población.

- El documento US 2004/229210 divulga un método y un aparato para la adquisición de información relativa a una población celular sometidas a una determinada manipulación (por ejemplo, interacción con un fármaco candidato o productos biológicos tales como hormonas, factores de crecimiento, etc.) y para predecir, con base en la información así adquirida, cómo otros tipos de manipulaciones (conocidas o desconocidas) pueden afectar la población celular.
- 25

- El artículo de Fuchs et al., "Electronic sorting and recovery of single live cells from microliter sized samples" (Lab on a Chip 2006, 6, 121-126) divulga un sistema de clasificación y recuperación que permite manipular células individuales mediante trampas dielectroforéticas dinámicas generadas por un chip de silicio microelectrónico CMOS. En particular, se divulga un método para la identificación y manipulación de partículas de interés dentro de una población de partículas, comprendiendo el método: poner la población de partículas que contienen las partículas de interés en un dispositivo de microfluidos; identificar, para cada partícula de dicha población de partículas en dicho dispositivo microfluídico, al menos un parámetro de un conjunto de parámetros característicos $p_1, p_2, \dots, p_n$ de dichas partículas de interés; seleccionar de dicha población de partículas en dicho dispositivo microfluídico las partículas de interés comparando para cada partícula de dicha población de partículas en dicho dispositivo microfluídico dicho al menos un parámetro con un parámetro de referencia respectivo; en el que dicho parámetro de referencia se establece mediante los pasos de: almacenar en un dispositivo de memoria el al menos un parámetro identificado para cada partícula de dicha población de partículas al escanear todo el dispositivo de microfluidos; y separar dichas partículas de interés de la población de partículas con base en el parámetro de referencia respectivo, manejando solo las partículas de interés seleccionadas.
- 30
- 35
- 40

El documento US 2007/195324 divulga un sistema de detección de partículas para identificar y clasificar partículas, que está programado para capturar imágenes digitalizadas de las partículas generadas al dirigir una fuente de luz a través de un fluido que incluye la partícula.

- El documento US 2005/112541 divulga un sistema para analizar, clasificar y organizar partículas con base en una o más características deseadas, en particular características cromosómicas deseadas. El sistema comprende una pluralidad de unidades de citometría de flujo, cada una de las cuales es operable para clasificar partículas en una mezcla de partículas con un haz de radiación electromagnética.
- 45

- El documento WO 2004/088573 divulga un método para determinar las fases del ciclo celular. Se utiliza un marcador del ciclo celular que tiene una fluorescencia que varía de acuerdo con la fase del ciclo celular. Se pueden distinguir cuatro patrones diferentes de acuerdo con la expresión diferente del marcador de fase del ciclo celular.
- 50

El documento WO 01/11340 divulga un sistema para probar el efecto de fármacos en células en una microplaca formando imágenes de numerosas células con óptica de fluorescencia y convirtiendo la información óptica en datos digitales.

El artículo de Voldman et al., "Engineered systems for the physical manipulation of single cells" (Current opinion in biotechnology, 17(5):532-537) proporciona una descripción general de los sistemas de ingeniería para manipular físicamente células individuales.

Divulgación de invención

- 5 Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la identificación y manipulación (con la consiguiente selección y/o aislamiento) de partículas raras dentro de una población de interés, superando los inconvenientes descritos anteriormente.

10 En particular, un objeto de la invención es proporcionar un método para identificar y seleccionar partículas raras rápidamente y con alta sensibilidad, limitando así los costes y tiempos de análisis y evitando el desperdicio de muestra útil o la pérdida de información.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método como se reivindica en la reivindicación 1.

Breve descripción de los dibujos

15 Otras ventajas y características de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de una realización preferida, proporcionada únicamente a modo de ejemplo no limitativo y con referencia a las figuras de los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es una representación esquemática de un sistema que proporciona el método para la selección optimizada de partículas de acuerdo con la invención;

La Figura 2 es un diagrama de flujo de las fases del método de la invención;

20 La Figura 3 es una reproducción de una captura de pantalla de la interfaz de un programa para la implementación del método de selección de partículas optimizado de acuerdo con la invención, que contiene una lista de partículas observadas y seleccionadas; para cada uno de estos, se muestran los valores medidos respectivos de una pluralidad de parámetros experimentales y las imágenes adquiridas escaneando la muestra en uno o más canales de luz a diferentes longitudes de onda;

25 La Figura 4 es una reproducción adicional de la captura de pantalla del programa de la Figura 3 que muestra, para cada una de las partículas observadas en la lista, los valores medidos respectivos de una pluralidad adicional de parámetros experimentales y las imágenes relativas adquiridas al escanear la muestra;

30 La Figura 5 es una reproducción de una captura de pantalla adicional de la interfaz de un programa para la implementación del método de selección de partículas optimizado de acuerdo con la invención, que muestra para una partícula observada seleccionable una multiplicidad de histogramas representativos de la tendencia de uno o más parámetros experimentales medidos para la partícula

La Figura 6 es una reproducción de una captura de pantalla adicional de la interfaz de un programa para la implementación del método de selección de partículas optimizado de acuerdo con la invención, que muestra simultáneamente todas las partículas observadas para reproducir su disposición real en la muestra escaneada;

35 La Figura 7 es una reproducción de una captura de pantalla adicional de la interfaz de un programa para la implementación del método de selección de partículas optimizado de acuerdo con la invención, que muestra solo las partículas seleccionadas de acuerdo con el método para reproducir su disposición real dentro de la muestra escaneada;

40 La Figura 8 es una reproducción de una captura de pantalla adicional de la interfaz de un programa para la implementación del método de selección de partículas optimizado de acuerdo con la invención, en el que los valores relacionados con dos parámetros experimentales medidos para la población de partículas se muestran en un diagrama de dispersión;

La Figura 9 es una imagen que muestra un dispositivo híbrido o chip de silicona/plástico para el manejo de partículas de acuerdo con el método de la invención;

45 La Figura 10 es una representación esquemática de una porción del dispositivo de la Figura 9 que muestra una posible realización de una fase de descarte/recuperación de las partículas seleccionadas de acuerdo con el método de la invención;

La Figura 11 muestra la selección de partículas determinadas dentro de una población de partículas como en la técnica conocida, usando un valor umbral determinado a priori, es decir, antes del examen de la muestra completa.

Mejor modo para llevar a cabo la invención.

El sistema 1 para la selección optimizada de partículas ilustrado en la Figura 1 se basa en el uso de tecnología comercial y comprende un microscopio de epifluorescencia vertical (Olympus) 2 que comprende un marco (no ilustrado) que soporta una superficie 3 motorizada horizontal (o también platina) y un sistema 4 óptico colocado sobre la superficie 3 horizontal.

- 5 La superficie 3 horizontal está equipada con nanomotores paso a paso con extrema precisión de posicionamiento ($\sim \pm 3$ mm) en el plano XY y está sostenida por un soporte (no ilustrado), equipado con nanomotores de pasos con extrema precisión de posicionamiento ($\sim \pm 0,01$ mm), montado de forma deslizante en un portaobjetos vertical conectado al marco del microscopio para permitir una definición exacta del foco en el eje Z.

- 10 El sistema 4 óptico comprende un iluminador (no ilustrado), un conjunto de filtros de fluorescencia (no ilustrado) y una unidad 5 óptica móvil que comprende una Cámara 6 CCD (Orca ER Hamamatsu) con resolución de 1600 x 1200 megapíxeles y una torreta 7 revólver, equipada con varios lentes con diferentes poderes de aumento, que puede girar para colocar el lente elegido sobre la superficie 3 motorizada.

- 15 El iluminador y el sistema de filtros que definen el sistema de epifluorescencia comprenden una fuente de luz blanca de amplio espectro, un primer bloque de filtro (bloque FITC) con un filtro de excitación de 460-495 nm (azul), un filtro de emisión de 515-550 nm (verde) y espejo dicróico a 505 nm, y un segundo bloque de filtro para iluminación de campo brillante y se fijan al marco del microscopio 2.

- 20 La Figura 9 ilustra un dispositivo 8 microfluídico híbrido de silicio/plástico (o también chip) para la manipulación de partículas en suspensión en un líquido como se describe en Lab Chip 2006, 6, 121-126. El chip 8 comprende una cámara de manipulación de partículas 9 con dimensiones de 16 mm x 16 mm y definida por una pared base, una pared superior, sustancialmente paralela a la pared base, y un elemento espaciador que se coloca entre la base y las paredes superiores para mantener la base y las paredes superiores a una cierta distancia equivalente a su altura. La cámara de manipulación tiene una cámara interna que está delimitada en la parte superior e inferior por la pared 13 superior y la pared de base respectivamente, y lateralmente por el elemento espaciador. La cámara interna tiene una forma sustancialmente paralelepípeda con base cuadrada y comprende una pared 1 de separación dispuesta paralela a una pared lateral de la cámara interna que define dos cámaras 11, 12 con forma sustancialmente paralelepípeda y base rectangular limitada lateralmente por la pared 1 de separación, la primera de las cuales 11 constituye una cámara de carga de muestras (aproximadamente 2.9 μ l) y la segunda 12 una cámara de recuperación de muestras (aproximadamente 0.6 μ l). La pared 1 de separación tiene una interrupción 18 de ancho de 300 μ m en la proximidad de una pared lateral de la cámara interna que constituye el canal 18 de comunicación entre la cámara 11 de carga de muestra y la cámara 12 de recuperación de muestra.

La pared 13 superior de la cámara de manipulación, de forma sustancialmente paralelepípeda y base cuadrada, es transparente, de policarbonato y tiene cuatro aberturas 14,15,16,17, dos de las cuales 14,15 están colocadas en la cámara de carga y dos 16,17 en la cámara de recuperación, que son adecuadas para conectar la cámara interna con la exterior.

- 35 La pared de base de la cámara interna está provista con una matriz o rejilla de electrodos de dielectroforesis que constituyen la superficie del chip 8, cada uno de los cuales puede controlarse individualmente para crear jaulas de dielectroforesis capaces de manejar partículas individuales dentro de la rejilla. De acuerdo con un aspecto del método de acuerdo con la invención, las partículas se manipulan después de que cada una de ellas haya sido capturada en un sitio específico de una pluralidad de sitios puestos a disposición mediante la activación de los electrodos que constituyen la superficie del chip 8. De manera análoga a la estructura física del chip 8, los sitios en los que se capturan las partículas también están dispuestos dentro del dispositivo de manipulación de acuerdo con una matriz.

Cabe señalar que el chip 8 está provisto con dos cámaras (11, 12) diferentes y distintas, conectadas hidráulicamente y delimitadas en al menos una cara de la pared base del chip. Alternativamente, es posible proporcionar chips separados, conectados hidráulicamente entre sí.

- 45 El chip 8 comprende además un circuito impreso al que se pega la cámara de manipulación, en el que se definen los circuitos electrónicos para controlar por separado los electrodos individuales de la matriz y un conjunto de contactos que dirigen los circuitos electrónicos.

El chip 8 constituye un dispositivo microfluídico para la manipulación de partículas, o preferiblemente células, que se puede utilizar ventajosamente como dispositivo desechable.

- 50 En uso, cuando un operador utiliza una de las aberturas 14 (16) de la cámara 11 de carga para depositar una muestra (en una fase sustancialmente líquida) en la cámara interna, la otra abertura 16 (14) de la cámara 11 de carga actúa como una descarga. Dada la reducida dimensión del canal de comunicación entre la cámara 11 de carga y la cámara 12 de recuperación, se forma un menisco de aire/agua en el canal que impide que la muestra penetre en el canal de recuperación. Posteriormente se llena la cámara 12 de recuperación con una solución amortiguadora que evita que las partículas presentes en la solución de muestra penetren en la cámara 12 de recuperación.

Una vez depositada la muestra en el chip 8, se coloca el dispositivo sobre la superficie 3 motorizada y se posiciona mediante tornillos (no ilustrados) en un alojamiento 19 adecuado obtenido en la superficie motorizada.

Dicho alojamiento 19 comprende los conectores (no ilustrados) a los que se conecta el sistema de control de los electrodos de dielectroforesis; durante el uso el acoplamiento entre los contactos del chip 8 de manipulación y los conectores presentes en la superficie 3 motorizada horizontal permite el control de cada electrodo de dielectroforesis.

Para recuperar las células de interés presentes en la solución de muestra, se define una trayectoria P en la pared base de la cámara interna del chip 8, que consiste en un conjunto de electrodos de dielectroforesis. Dicho trayecto define una salida que se extiende por el canal 18 de comunicación para transportar las células de interés desde un punto inicial P1 de la cámara 11 de carga hasta un punto final P2 de la cámara 12 de recuperación. Activando sucesivamente los electrodos de dielectroforesis presentes en la trayectoria P en dirección a la cámara 12 de recuperación, las células de interés se trasladan de la solución muestra a la solución amortiguadora, en la que se sumergen y luego se recuperan.

Como se ilustra en la Figura 1, el sistema 1 para la selección optimizada de partículas comprende además una unidad 20 de control externa conectada al microscopio 2 por medio de cables eléctricos (no ilustrados), que se aloja en una o más unidades externas (no ilustrado), algunos de los cuales también pueden ser sostenidos mecánicamente por el marco del microscopio 2. En particular, la unidad 20 de control comprende un primer dispositivo 21 de control para la gestión de la platina 3 motorizada, un segundo dispositivo 22 para la gestión de la unidad óptica y adquisición de las imágenes de la cámara y un tercer dispositivo 23 para la gestión de las señales de control de los electrodos de dielectroforesis.

Cabe señalar que la unidad 20 de control externa puede comprender un ordenador industrial de tipo conocido conectado mediante una red Ethernet (preferiblemente operando de acuerdo con el protocolo TCP/IP) a las unidades externas o alternativamente puede comprender una o más unidades externas provistas por medio de electrónica dedicada, conectadas entre sí por red Ethernet (preferiblemente operando de acuerdo con el protocolo TCP / IP).

Además, el sistema 1 para la selección de partículas optimizada comprende uno o más dispositivos 24 de interfaz de usuario (de los cuales solo se muestra uno en la figura) también llamados dispositivos "HMI" (Interfaz Hombre-Máquina). Cada dispositivo HMI 24 comprende un ordenador de tipo conocido provisto con una pantalla (no ilustrada en la figura 1) para visualizar los datos y un dispositivo de introducción (no ilustrado en la figura 1), que normalmente está definido por un teclado y/o un dispositivo señalador y también se puede integrar en la pantalla mediante la función de pantalla táctil. Cada dispositivo HMI 24 permite a un operador interactuar con la unidad 20 de control del microscopio 2 permitiendo a dicho operador, por ejemplo, enviar información de configuración relativa a la cámara 6, seleccionar y posteriormente posicionar los filtros o lentes elegidos del revólver 7 o mover la platina 3 motorizada a una posición dada para visualizar las células presentes en una determinada posición en la superficie del chip 8 de manipulación después de la carga de una muestra.

Otros ordenadores 30, 31, 32, que pueden disponerse en configuración local o remota, se pueden conectar al dispositivo 24 HMI a través de una red Ethernet (preferiblemente funcionando de acuerdo con el protocolo TCP/IP). Por ejemplo, un ordenador 30 es un ordenador industrial o de oficina, ubicado en un laboratorio o en cualquier caso en un espacio reservado para análisis de laboratorio, un ordenador 31 es un ordenador de oficina y está ubicado en el mismo edificio que el laboratorio, un ordenador 32 es un ordenador de oficina y se encuentra a una distancia considerable del laboratorio. Los ordenadores 30 y 31 están conectados al dispositivo 24 HMI únicamente a través de una red de tipo Ethernet/Intranet, mientras que los ordenadores 32 están conectados al dispositivo 24 HMI a través de Internet. Cabe señalar que los ordenadores ubicados a una distancia considerable del laboratorio pueden visualizar los mismos datos que el ordenador ubicado en el laboratorio.

El dispositivo 24 HMI comprende un primer dispositivo 25 de comunicación que dialoga (es decir, intercambia datos de forma bidireccional) con la unidad de control del sistema para la selección optimizada de partículas, un dispositivo 26 de almacenamiento que también implementa una base de datos (por ejemplo, SQL, SQL Light, etc.), y un segundo dispositivo 27 de comunicación que dialoga (es decir, intercambia datos de forma bidireccional) con el usuario. El primer dispositivo 25 de comunicación proporciona el protocolo de acceso a los datos de la unidad de control e implementa los comandos de control de cada dispositivo periférico diferente presente, por ejemplo, platina 3 motorizada, unidad 5 óptica móvil, cámara 6.

El segundo dispositivo 27 de comunicación proporciona la interfaz gráfica de usuario real.

Los dos dispositivos de comunicación dialogan principalmente entre sí solo de forma indirecta, es decir, dialogan entre sí a través del dispositivo 26 de almacenamiento; es decir, salvo comandos específicos con los que el usuario controla dispositivos específicos, el primer dispositivo 25 de comunicación lee/escribe datos en el dispositivo 26 de almacenamiento y al mismo tiempo el segundo dispositivo 27 de comunicación lee/escribe datos en el dispositivo 26 de almacenamiento de forma esencialmente aleatoria (es decir, cuando el operador decide utilizar la interfaz de usuario).

El primer dispositivo 25 de comunicación, el segundo dispositivo 27 de comunicación y el dispositivo 26 de almacenamiento se proporcionan habitualmente mediante programas respectivos (software) que constituyen en su conjunto un programa de manipulación de partículas (software). En particular, el programa (software) que proporciona el segundo dispositivo 27 de comunicación constituye la interfaz gráfica de usuario y proporciona medios de

procesamiento de imágenes a través de los cuales se extraen los parámetros $p_1 \dots p_n$ característicos de cada partícula. De manera análoga, el programa (software) que proporciona el segundo dispositivo 27 de comunicación proporciona de manera más genérica medios para procesar al menos una función de los parámetros detectados. Además, el mismo programa (software) que proporciona el segundo dispositivo 27 constituye medios de selección de partículas y medios para establecer un criterio de selección que se va a utilizar como parámetro de referencia para realizar dicha selección.

Dichos programas suelen residir en el ordenador que forma parte del panel del dispositivo 24 HMI pero alternativamente pueden residir en otros ordenadores situados local o remotamente e intercambiar datos a través de las redes Intranet y/o Internet.

En uso, se escanea toda la superficie del chip y se adquieren y almacenan varias imágenes en un área 28 del dispositivo de almacenamiento (15 imágenes parcialmente superpuestas para cada línea con un total de 20 líneas) que permiten una evaluación precisa del contenido del chip con un grado de definición adecuado. Las imágenes almacenadas se procesan mediante edición gráfica que permite identificar las celdas presentes y, para cada celda identificada, almacenar los datos característicos de cada celda, es decir, los parámetros $p_1 \dots p_n$, en el dispositivo de almacenamiento en un área 29 que implementa una base de datos SQL.

Cabe señalar que alternativamente o en paralelo al escaneo de toda la superficie del chip por medio de un sensor externo tal como la cámara, es posible utilizar sensores (no ilustrados) dentro del chip para detectar los datos característicos de cada célula. Como se describe en el documento WO2007/049103, es posible, por ejemplo, que la superficie del chip 8 comprenda tanto electrodos de dielectroforesis como sensores ópticos (o impedenzimétricos) capaces de detectar los parámetros $p_1 \dots p_n$ característicos de cada célula.

Además, cabe señalar que el manejo de cada celda se puede realizar con éxito mediante técnicas de manipulación alternativas a la dielectroforesis (por ejemplo, atrapamiento de optoforesis, electrohumectación en dieléctrico - EWOD), a condición de que las células se manipulen en dispositivos microfluidicos, cada uno ha sido capturado en un sitio genérico de una pluralidad de sitios que pueden ser controlados individualmente.

A modo de ejemplo no limitativo, se describirá ahora una realización preferente del método de acuerdo con la presente invención, siguiendo el diagrama de flujo mostrado en la Figura 2.

Para empezar (bloque 100), se identifica el experimento que se va a llevar a cabo recogiendo información relativa al operador y la muestra que se va a analizar. A continuación, el sistema realiza en modo automático (bloque 110) una serie de operaciones para verificar la correcta conexión y/o configuración y/o calibración de la unidad 20 de control en relación con los dispositivos que constituyen el microscopio 2, garantizando así el correcto funcionamiento durante el experimento. Generalmente se programa una comprobación preliminar (bloque 120) con el fin de asegurar que no hay contaminantes presentes en la superficie del chip 8, y más particularmente a lo largo de la trayectoria P de la salida. Si esta comprobación identifica la presencia de contaminantes, se interrumpe el experimento (bloque 130) mientras que, si el resultado es negativo, se deposita la muestra (bloque 140). En este punto (bloque 150) se repite la verificación de la ausencia de contaminantes para excluir la posibilidad de introducción de otras sustancias no deseadas en la superficie del chip junto con la muestra que se va a analizar. En el caso de contaminación, el operador obviamente puede recuperar la muestra previamente depositada para que pueda ser reutilizada en otro experimento.

Una vez completada esta comprobación, se puede iniciar la fase de análisis real. Se escanea toda la superficie del chip (bloque 160) en modo automático y mediante un apropiado proceso de edición gráfica, se identifica y almacena un conjunto de datos característicos de cada partícula, es decir, los parámetros $p_1 \dots p_n$ en la base de datos (o también medios de almacenamiento).

Habiendo adquirido las imágenes de toda la superficie del chip y almacenado los parámetros característicos de cada partícula, el operador puede establecer un criterio de selección de las partículas de interés después de adquirir información sobre toda la muestra (bloque 170) (el criterio de selección puede ser, por ejemplo, la elección de partículas con una determinada morfología, la elección de las partículas más brillantes o la elección de partículas raras con determinadas características). En particular, el criterio de selección se establece con base en el resultado del procesamiento de los datos adquiridos para cada partícula.

A nivel práctico, la interfaz gráfica muestra al operador una captura de pantalla (Figuras 3 y 4) que contiene el listado de las partículas, células en este caso concreto, observadas por barrido óptico de toda la muestra. Para cada uno de ellos se pueden mostrar los valores de una multiplicidad de parámetros experimentales medidos durante el escaneo, tales como parámetros ópticos (transparencia, opacidad, uniformidad de intensidad luminosa), parámetros morfológicos (factor de área o también medición indirecta del haz en píxeles, factor de forma, factor de redondez o esfericidad, etc.), posicionamiento correcto dentro de una célula (sitio) de la cuadrícula del chip 8, luminosidad medida en canales de luz correspondientes a diferentes longitudes de onda, etc. En términos generales, los parámetros medidos para las partículas también pueden referirse a las propiedades bioeléctricas y/o bioquímicas (por ejemplo, es posible establecer si una célula está viva o muerta estudiando a lo largo del tiempo la descomposición de la fluorescencia de las células) marcado con calceína o, analizando imágenes tomadas en un determinado intervalo de tiempo, medir la absorción de un tinte, etc.), o propiedades mecánicas (por ejemplo, la elasticidad de una partícula se

- puede determinar sometiéndola a un impulso de dielectroforesis capaz de deformarla; observando el tiempo necesario para que la partícula vuelva a su forma original, se puede deducir un factor de elasticidad de la partícula), o propiedades dieléctricas (si la partícula observada se ubica en una celda de la rejilla del chip 8, entonces se está tratando con partículas que pueden ser manipuladas mediante NDEP, mientras que si la partícula se localiza entre celdas adyacentes de la rejilla del chip 8, entonces se está tratando con partículas que pueden ser manipuladas mediante PDEP), o -en el caso de células- la expresión de antígenos de superficie o intracitoplasmáticos, o una combinación apropiada de ellos. Los datos se adquieren mediante el uso de una pluralidad de sensores, que pueden ser internos o externos al dispositivo 8 híbrido.
- Para ello, el método de acuerdo con la invención también puede comprender una fase de marcado de las partículas (o células, en este caso) en suspensión con al menos un marcador que se puede detectar mediante uno de dichos sensores en el interior y/o fuera del chip. Para cada una de las celdas, se almacenan y muestran además las coordenadas que definen su disposición con respecto a la superficie del chip 8.
- Mediante una captura de pantalla adicional (Figura 5) se muestran al operador diagramas que ilustran la distribución, con respecto a la población celular, del valor de los parámetros experimentales $p_1, p_2, \dots, p_n$ medidos durante el escaneo y almacenados, y el valor de una o más funciones de al menos uno de dichos parámetros procesados apropiadamente por el sistema. Al definir adecuadamente un criterio de selección, el operador puede usar la interfaz para seleccionar un subconjunto de partículas de la población en cuestión: modificando la posición de los cursores 34 en los histogramas de la Figura 5, el operador puede establecer valores umbral por debajo y/o por encima de los parámetros medidos y/o por debajo y/o por encima de las respectivas funciones de los mismos.
- Dichos valores umbral inferior o superior y/o dichos intervalos de interés (por ejemplo correspondientes a una porción de interés de la función de los parámetros p_i procesados y asociados al criterio de selección, o a una porción de la distribución del valor de dicha función dentro de la población de partículas, y por lo tanto entre un valor umbral inferior y un valor umbral superior) constituyen un "criterio umbral" con el que se compara el valor de la función de los parámetros p_i con el fin de realizar la selección de las partículas de interés.
- Dichos valores de umbral pueden ser elegidos por el operador después de evaluar las propiedades de la muestra celular en su conjunto, en particular con base en el valor procesado por el sistema de las funciones de los parámetros almacenados, o un procedimiento puede ser automáticamente implementado que identifica las partículas que responden a un determinado criterio de selección, que puede variar de un experimento a otro, con base en los datos recolectados para toda la población probada.
- Además, conviene señalar que, en este último caso, el operador puede elegir si implementar el procedimiento de selección automática para la selección final o controlar alternativamente la propuesta de selección automática, refinándola mediante la comprobación manual de los resultados.
- Es importante subrayar que los valores umbral de las cantidades de interés en el experimento no se establecen a priori; con base en la información relativa a toda la muestra obtenida mediante el escaneo, el criterio de selección y consecuentemente los valores umbral relativos se eligen de manera adaptativa, con el fin de identificar y manejar las celdas que cumplen los requisitos dados.
- Por lo tanto, de acuerdo con el método de la invención, es posible seleccionar las celdas que tengan las mejores características en general para el uso posterior previsto, es decir, aquellas para las que el valor de una función de mérito apropiada definida en una base de tiempo se optimiza.
- De esta manera, la interfaz 27 de usuario constituye un medio para la selección de partículas y, además, un medio para establecer un criterio de umbral que se va a usar como un parámetro de referencia para la selección.
- De acuerdo con el destino posterior de las células -por ejemplo, uso en experimentos adicionales- el criterio de selección se puede modular para obtener un número suficiente de células que cumplan los requisitos dados, haciéndolas adecuadas para el siguiente paso experimental.
- Definiendo los umbrales de interés a través de la interfaz de la Figura 5 (bloque 170), el operador realiza simultáneamente una selección dentro de la población de partículas, identificando aquellas para las que los valores de los parámetros $p_1, p_2, \dots, p_n$ tienen medido y para las que se han calculado los valores de las funciones que caen dentro de los intervalos de interés definidos por los umbrales establecidos gráficamente con los cursores 34.
- El operador es asistido si es necesario para posicionar los cursores 34 en los histogramas de la Figura 5: a pedido, la interfaz muestra una captura de pantalla adicional (no ilustrada) para cada barra de histograma con las imágenes de las partículas asociadas con esa barra.
- A modo de ejemplo no limitativo, la Figura 5 muestra, en una primera columna, histogramas relativos a la distribución, en la población ensayada, de características morfológicas de las partículas tales como dimensión, factor de redondez y corrección de posicionamiento en una de las células del dispositivo utilizado para la manipulación. En una segunda columna a la derecha de la anterior, se encuentran histogramas que muestran la tendencia de funciones complejas con base en una combinación adecuada y/o procesamiento de diferentes parámetros medidos que pueden usarse

como índices de propiedades no directamente medibles. Como ejemplo de combinación, se pueden combinar los resultados relacionados con las mediciones de luminosidad realizadas a diferentes longitudes de onda, cada una correspondiente a un marcador específico asociado con la presencia/ausencia de una determinada característica (por ejemplo, del núcleo celular, de un antígeno específico, de fluorescencia espontánea de la partícula, etc.). Como ejemplo de procesamiento, los resultados relativos a las mediciones de luminosidad se pueden procesar para tener en cuenta y, si es necesario, compensar la diferente iluminación del iluminador en diferentes áreas del chip 8.

Después de realizar la selección dentro de la población de partículas mediante la interfaz de la Figura 5, el usuario puede refinar posteriormente la selección ya realizada (bloque 180 - Refinamiento de la Selección). Para las partículas que cumplen con los criterios umbral establecidos a través de las capturas de pantalla de la Figura 5 (bloque 190), el usuario puede verificar las partículas seleccionadas ya que, a través de las capturas de pantalla de las Figuras 3 y 4, puede visualizar, para cada partícula, sus dos parámetros característicos y las imágenes adquiridas durante el escaneo de la muestra. Estas imágenes, mostradas en uno o más canales de luz a diferentes longitudes de onda (a modo de ejemplo no limitativo en las figuras 3 y 4 se muestran las imágenes de celdas en los canales DAPI, FITC y TRITC), permiten al operador decidir si definitivamente seleccionar o no una partícula inicialmente preseleccionada y por lo tanto las capturas de pantalla de las Figuras 3 y 4 constituyen medios de control para refinar la selección ya realizada. De hecho, aunque la partícula se ha preseleccionado inicialmente, puede ser una impureza y, por lo tanto, no es útil para los propósitos de los protocolos experimentales posteriores.

La interfaz 27 gráfica de usuario también ofrece al operador un medio adicional de control para refinar la selección ya realizada, que consiste en la posibilidad de ver cada partícula seleccionada a través de los oculares del microscopio. Al activar un botón de control (no ilustrado), la partícula seleccionada se coloca automáticamente justo debajo del lente del microscopio y esto permite al operador ver la partícula a través de los oculares.

Cabe señalar que la partícula seleccionada se posiciona automáticamente debajo del microscopio ya que, cuando se activa el botón de control, la interfaz 27 gráfica de usuario comunica a la unidad 20 de control las coordenadas de la partícula de interés dentro de la cuadrícula del chip 8 y la unidad 20 de control mueven con precisión la platina almacenada en el plano XY para alinear la partícula (posición dentro de la rejilla del chip 8) con el lente del microscopio. Si es necesario, la unidad 20 de control mueve automáticamente la platina motorizada a lo largo del eje Z para enfocar la partícula seleccionada.

Al final de dicha fase de control adicional, el operador puede decidir si la partícula es de interés o si debe considerarse una impureza.

De esta manera, la interfaz 27 gráfica de usuario constituye un medio para la selección de partículas y, además, un medio de control para refinar la selección de las partículas de interés. Si el sensor es externo al dispositivo microfluídico y consiste en una cámara o incluso si el sensor es interno al dispositivo microfluídico y consiste en un sensor óptico, los medios de control comprenden medios para mostrar las imágenes de cada partícula.

La interfaz ofrece al operador más posibilidades: es posible observar la disposición en la superficie del chip de todas las partículas de la muestra (Figura 6) o solo las partículas realmente seleccionadas (Figura 7), estableciendo los valores umbral de una manera adaptativa como se describe anteriormente. Cabe señalar que las coordenadas de las partículas mostradas en la captura de pantalla de la interfaz de la Figura 6 corresponden a las de la muestra en el chip 8, y por lo tanto tienen una distribución que refleja la estructura física relativa. En particular, se puede identificar en la parte inferior de la captura de pantalla de la Figura 6 una banda horizontal en la que no se encuentran presentes partículas, que corresponde a la cámara 12 de recuperación para las partículas seleccionadas. De manera análoga, no aparecen partículas en la porción superior porque esa porción de la cámara 11 de carga se utiliza para albergar las partículas desechadas.

La Figura 8 muestra una captura de pantalla adicional de la interfaz en la que el operador puede ver, en forma de diagrama de dispersión, la distribución de dos parámetros o funciones de interés en la población de partículas. A modo de ejemplo no limitativo, la Figura 8 muestra los valores de luminosidad medidos a dos longitudes de onda diferentes, cada una correspondiente a un marcador específico. Mediante el uso de comandos apropiados, el operador puede visualizar en un diagrama de dispersión análogo los valores relativos a otros parámetros y/o funciones. También a través de esta forma de visualización, el operador puede establecer valores umbral para definir un criterio de selección adecuado y seleccionar simultáneamente las partículas que responden a dichos requisitos, como se discutió anteriormente con referencia a la representación mediante histogramas.

Una vez completada esta fase, habiendo definido un criterio de selección y habiendo realizado sustancialmente una selección inicial de las partículas que cumplen dicho criterio, el siguiente paso del procedimiento (bloque 190) implica el control (si es necesario incluso una a una) de las partículas seleccionadas en el paso anterior, refinando dicha selección si es necesario.

A continuación, el operador puede confirmar la selección de las partículas realizada en la fase anterior habiendo analizado globalmente toda la población contenida en el chip, verificando la corrección de su elección ya que puede analizar en detalle las características específicas de cada célula individual. Las posibilidades que ofrece la interfaz incluyen la de ordenar las partículas de acuerdo con el valor de cualquiera de los campos disponibles, por ejemplo, de

acuerdo con la intensidad de luz creciente en el campo DAPI en el caso de las células, si la intención es seleccionar las "mejores" células para una serie de experimentos posteriores, o si el usuario desea seleccionar células con valores de intensidad de luz similares entre sí en un canal específico.

Si el usuario no está satisfecho con la elección ya realizada, puede volver (bloque 180) a la fase anterior para afinar aún más la selección, variando si es necesario el criterio de selección previamente establecido. Si por el contrario el resultado de la selección es cuantitativa y cualitativamente satisfactorio, el siguiente paso del método es proceder con una primera fase de transferencia o enrutamiento (bloque 200), es decir, manipulación automatizada de las partículas con el objetivo de transferir las partículas seleccionadas desde la posición que ocupaba originalmente en la superficie del chip hasta una posición, también almacenada por el sistema, en la salida para el transporte de las partículas hacia la cámara 12 de recuperación. Esta constituye la primera parte del viaje de las partículas seleccionadas hacia la cámara de recuperación. De acuerdo con la geometría específica del dispositivo de manipulación utilizado cada vez, se puede proporcionar una única salida central, o el dispositivo puede comprender varias salidas en paralelo para acelerar y facilitar la operación de enrutamiento. Dicha operación separa las partículas de interés previamente seleccionadas, manipulando únicamente estas partículas dentro de la muestra.

En este punto, el método programa un paso de control adicional (bloque 220) en la salida obtenida realizando un nuevo escaneo (bloque 210) para adquirir las imágenes de la salida y las partículas contenidas en ella. A partir de la información obtenida de estas imágenes, el usuario decidirá, de entre todas las partículas seleccionadas en la primera fase de transferencia, qué partículas/células desechar y cuáles extraer del chip y transportar a la cámara 12 de recuperación.

Dicha fase de control adicional se realiza comparando para cada partícula la fotografía de la partícula en su posición original y en su posición en la salida con el fin de asegurar que la primera fase de transferencia realmente ha manipulado la partícula seleccionada, la cual puede no llegar correctamente en su destino en la salida.

Como se ilustra en la Fig. 10, a lo largo de la trayectoria P de la salida se puede identificar una estación 33 de descarte que comprende una matriz 34 de electrodos de selección que verifican, para cada partícula, si dicha partícula debe descartarse o recuperarse, de acuerdo con el resultado del control de salida (bloque 220). Si se selecciona la partícula, pasa a la cámara de recuperación, mientras que, si se desecha, se transporta a una salida de descarte definida en una porción de la cámara 11 de carga. Dicha fase de recuperación de las partículas seleccionadas se realiza manipulando únicamente dichas partículas.

A esto le sigue la segunda fase de transferencia o fase de ruta de salida, cuyo objetivo es transportar todas las partículas seleccionadas y confirmadas hasta ese momento a la cámara de recuperación. Desde dicha cámara, las partículas se pueden recuperar y, si es necesario, usarse para posteriores fases de análisis, en dispositivos externos o también in situ.

El sistema utilizado para realizar la selección optimizada de las partículas de interés, una vez finalizado el procedimiento, emite un informe (bloque 260) que contiene la información relativa al análisis recién realizado.

Ejemplo 1 - Eliminación de grupos

Una de las muchas aplicaciones potenciales del método de acuerdo con la presente invención es la eliminación de una población de partículas agrupadas para formar grupos si no se desea su presencia, por ejemplo, en el caso del uso posterior de partículas individuales solamente. Esto ocurre, por ejemplo, en el caso de la separación de células vivas: si el operador desea realizar un análisis posterior en células individuales, la presencia de grupos en la muestra podría alterar la adquisición de los datos o incluso el resultado de la prueba.

En este caso, el operador puede observar (Figura 3), a través de la interfaz que implementa el método de acuerdo con la invención, las partículas y grupos de partículas que constituyen la muestra, e identificar una pluralidad de parámetros para cada uno de ellos. En particular, en este caso, se medirá el radio de la partícula o grupo, en combinación con las coordenadas correspondientes con respecto a la superficie del dispositivo de manipulación, y también se evaluará un factor de redondez de la partícula. Por último, se comprobará que la partícula se encuentra realmente ubicada en un sitio correspondiente en uso a una de las celdas de dielectroforesis utilizadas para la manipulación. Para apoyar la selección, también se procesarán las imágenes de las partículas o grupos obtenidas durante el escaneo integral de la muestra realizado antes del inicio de las operaciones de selección.

Usando los cursores relativos a una captura de pantalla posterior de la interfaz (Figura 5) de manera apropiada, el operador selecciona un valor umbral superior para la dimensión (radio) de las partículas y/o para la redondez, seleccionando por lo tanto (y luego retirándolos del dispositivo) aquellos en los que los datos medidos superen dicho umbral. Cabe señalar que el índice de probabilidad de un grupo es una función de varios parámetros característicos de la célula, por ejemplo, la dimensión y la redondez. De hecho, es muy probable que un radio grande medido no corresponda a una sola partícula con mayores dimensiones sino a un grupo y que una forma más larga no se refiera a una sola partícula sino a varias partículas agrupadas en una dirección principal, es decir, un grupo. Si, además, las partículas se encuentran al nivel de las jaulas de manipulación del dispositivo, se puede afirmar que el dato medido es relativo a partículas y no a impurezas presentes erróneamente en la superficie del dispositivo.

Habiendo definido apropiadamente valores umbral e intervalos de utilidad para las cantidades examinadas, el operador selecciona los grupos presentes en la muestra, verifica, si es necesario a posteriori, la exactitud de su selección y luego puede eliminar los grupos de la muestra, manteniendo selectivamente dentro del dispositivo de manipulación las partículas individuales, sobre las cuales podrá realizar el análisis en una etapa posterior dentro de dicho dispositivo.

5 Ejemplo 2 - Diagnóstico prenatal

Para una variedad de protocolos de diagnóstico prenatal es necesario proporcionar una concentración de una muestra de sangre materna, seleccionar dentro de ella los eritrocitos fetales y luego realizar un análisis genético en ellos. Para tal fin, es sustancialmente necesario identificar las células con núcleo, de origen fetal y no materno. Este tipo de determinación se puede realizar marcando las células con uno o más marcadores fluorescentes, por ejemplo, un primer marcador (DAPI) que se une al núcleo de una célula y un segundo marcador (FITC) que se une selectivamente a antígenos fetales y no fetales de origen materno. Detectando la intensidad de fluorescencia para los dos marcadores, en dos longitudes de onda respectivas separadas, es posible identificar las células para las que están presentes ambos marcadores. Dado que la detección de fluorescencia podría estar sujeta a error si las células presentan fenómenos de autofluorescencia inespecífica, es decir, detectables a cualquier longitud de onda -es preferible realizar una tercera detección de fluorescencia a una tercera longitud de onda (TRITC) para determinar qué células presentan dicho fenómeno y por lo tanto, debe excluirse, ya que la detección de fluorescencia en los canales DAPI y FITC no garantizaría por sí misma que las células sean células fetales nucleadas. En este sentido, de acuerdo con el método de la invención, se establece un criterio de selección para las células nucleadas fetales -estableciendo valores respectivos o intervalos umbral definidos con base en el procesamiento de una función de los parámetros medidos y almacenados -que en efecto minimiza la posibilidad de selecciones incorrectas, es decir, la selección de falsos positivos-.

Mediante la interfaz que implementa el método de acuerdo con la invención, el operador asociará con las coordenadas de las partículas en la superficie del dispositivo de manipulación el valor de una pluralidad de parámetros identificados durante el escaneo, además de las imágenes obtenidas en las diversas longitudes de onda consideradas, y el valor de una o más funciones de mérito calculado con base en los parámetros identificados. En particular (Figuras 3, 4 y 5), el operador evaluará la distribución dentro de la población celular del valor de varias funciones.

Una primera función es un índice de la probabilidad de que la célula sea una célula fetal nucleada (indicada como "fetal" en la Figura 5) y es un índice de la intensidad de fluorescencia en el canal FITC desarrollado para compensar la iluminación diferente en diferentes áreas del chip 8 por el iluminador; una segunda función (indicada por Dapi en la Figura 5) es un índice de la intensidad de fluorescencia en el canal DAPI y es una función procesada de la intensidad de fluorescencia; una tercera función es un índice de la probabilidad de que la detección de fluorescencia en los canales DAPI y FITC sea realmente engañosa, ya que la partícula en cuestión presenta fenómenos de autofluorescencia (histograma no mencionado en la Figura 5).

Por lo tanto, el operador es capaz de establecer, a partir de la observación de toda la muestra y de forma adaptativa, intervalos de valores útiles de la función fetal y de los demás descritos anteriormente para seleccionar únicamente las celdas en las que se han determinado los criterios previamente discutidos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la identificación y manipulación de partículas de interés dentro de una población de partículas, comprendiendo el método:
poner la población de partículas que contienen las partículas de interés en un dispositivo (8) microfluídico;
5 escanear todo el dispositivo (8) microfluídico e identificar, para cada partícula de dicha población de partículas en dicho dispositivo (8) microfluídico, al menos un parámetro de un conjunto de parámetros característicos $p_1, p_2, \dots p_n$ de dichas partículas de interés;
seleccionar de dicha población de partículas en dicho dispositivo (8) microfluídico las partículas de interés comparando para cada partícula de dicha población de partículas en dicho dispositivo (8) microfluídico dicho al menos un parámetro
10 con un respectivo parámetro de referencia;
en el que dicho parámetro de referencia se establece caso por caso mediante los pasos de:
almacenar en un dispositivo de memoria el al menos un parámetro identificado para cada partícula de dicha población de partículas al escanear todo el dispositivo (8) microfluídico;
15 determinar en un dispositivo informático un valor de al menos una función de mérito de dicho al menos un parámetro almacenado;
procesar en un dispositivo informático el valor de dicha al menos una función de mérito de dicho al menos un parámetro almacenado para cada partícula de dicha población de partículas;
visualizar la distribución del valor de dicha función de mérito dentro de la población de partículas en una interfaz gráfica a un usuario;
20 combinar dicha función de mérito con un criterio de selección de dichas partículas de interés, siendo elegido dicho criterio de selección por el usuario de un grupo de posibles criterios de selección con base en la distribución visualizada del valor de dicha función de mérito dentro de la población de partículas; y
establecer para cada partícula de dicha población de partículas un criterio de umbral que se utilizará como dicho parámetro de referencia, siendo dicho criterio de umbral establecido por el usuario caso por caso con base en la
25 combinación de la función de mérito con dicho criterio de selección elegido; y
separar dichas partículas de interés de la población de partículas con base en el parámetro de referencia respectivo, manejando solo las partículas de interés seleccionadas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dichas partículas se mantienen en suspensión en un líquido en dicho dispositivo (8) microfluídico.
- 30 3. El método de la reivindicación 1, que comprende además almacenar en el dispositivo de memoria una posición inicial de dichas partículas de interés.
4. El método de la reivindicación 3, que además comprende:
mover las partículas de interés desde su posición inicial hasta una posición de transferencia respectiva; y
posteriormente almacenar en el dispositivo de memoria la posición de transferencia para la recuperación de cada
35 partícula ubicada en dicha posición de transferencia.
5. El método de la reivindicación 4, en el que cada partícula ubicada en la posición de transferencia se recupera manipulando dichas partículas ubicadas en la posición de transferencia únicamente.
6. El método de la reivindicación 4, que comprende además verificar que las partículas de interés seleccionadas se han movido correctamente desde su posición inicial hasta la posición de transferencia.
- 40 7. El método de la reivindicación 1, en el que dichas partículas seleccionadas se separan capturando cada una de ellas en un sitio específico de una pluralidad de sitios del dispositivo (8) microfluídico.
8. El método de la reivindicación 7, en el que dichos sitios están dispuestos dentro de dicho dispositivo (8) microfluídico de acuerdo con una matriz.
9. El método de la reivindicación 7, en el que dicho dispositivo (8) microfluídico está provisto con una pluralidad de
45 cámaras (11, 12) diferentes, distintas, y conectadas hidráulicamente entre sí, delimitadas en al menos una cara por una pared base de un solo chip o por una pluralidad de chips separados.
10. El método de la reivindicación 2, en el que dicho al menos un parámetro puede ser detectado por al menos un sensor ubicado dentro o fuera de dicho dispositivo (8) microfluídico.

11. El método de la reivindicación 1, que comprende además refinar la selección de dichas partículas de interés mostrando en dicha interfaz gráfica el resultado de la selección, en el que el refinado implica todas dichas partículas y/o solo las partículas previamente seleccionadas y cambiando el criterio de umbral con base en el resultado de la selección mostrado en dicha interfaz gráfica.
- 5 12. El método de la reivindicación 11, en el que refinar comprende controlar cada partícula seleccionada.
13. El método de la reivindicación 12, en el que controlar cada partícula seleccionada comprende visualizar ópticamente en dicha interfaz gráfica el conjunto de parámetros característicos que se pueden identificar para cada partícula mediante al menos un sensor dentro y/o fuera de dicho dispositivo (8) microfluídico. .
- 10 14. El método de la reivindicación 12 en el que al menos un parámetro puede ser detectado por medio de un sensor externo que consiste en una cámara, y controlar cada partícula seleccionada comprende visualizar las imágenes de cada partícula en dicha interfaz gráfica.
- 15 15. El método de la reivindicación 1, que comprende además elegir del grupo de posibles criterios de selección para la partícula de interés, un criterio que minimice la posibilidad de selecciones erróneas, dicha elección implica todas dichas partículas y/o solo las partículas previamente seleccionadas.
16. El método de la reivindicación 2, que además comprende marcar dichas partículas de dicha población de partículas en suspensión con al menos un marcador específico para dichas partículas de interés, siendo dicho marcador detectable por al menos un sensor dentro o fuera del dispositivo (8) microfluídico en el que dicha población de partículas se ha suspendido en dicho líquido.
- 20 17. El método de la reivindicación 1, en el que dicho al menos un parámetro se selecciona en el grupo que consiste en:
- a. morfología;
 - b. propiedades ópticas;
 - c. propiedades bioeléctricas;
 - d. propiedades bioquímicas;
 - 25 e. propiedades mecánicas;
 - f. expresión de antígenos de superficie;
 - g. expresión de antígenos intracitoplasmáticos;
 - h. propiedades dieléctricas;
 - y combinaciones de los mismos.

30

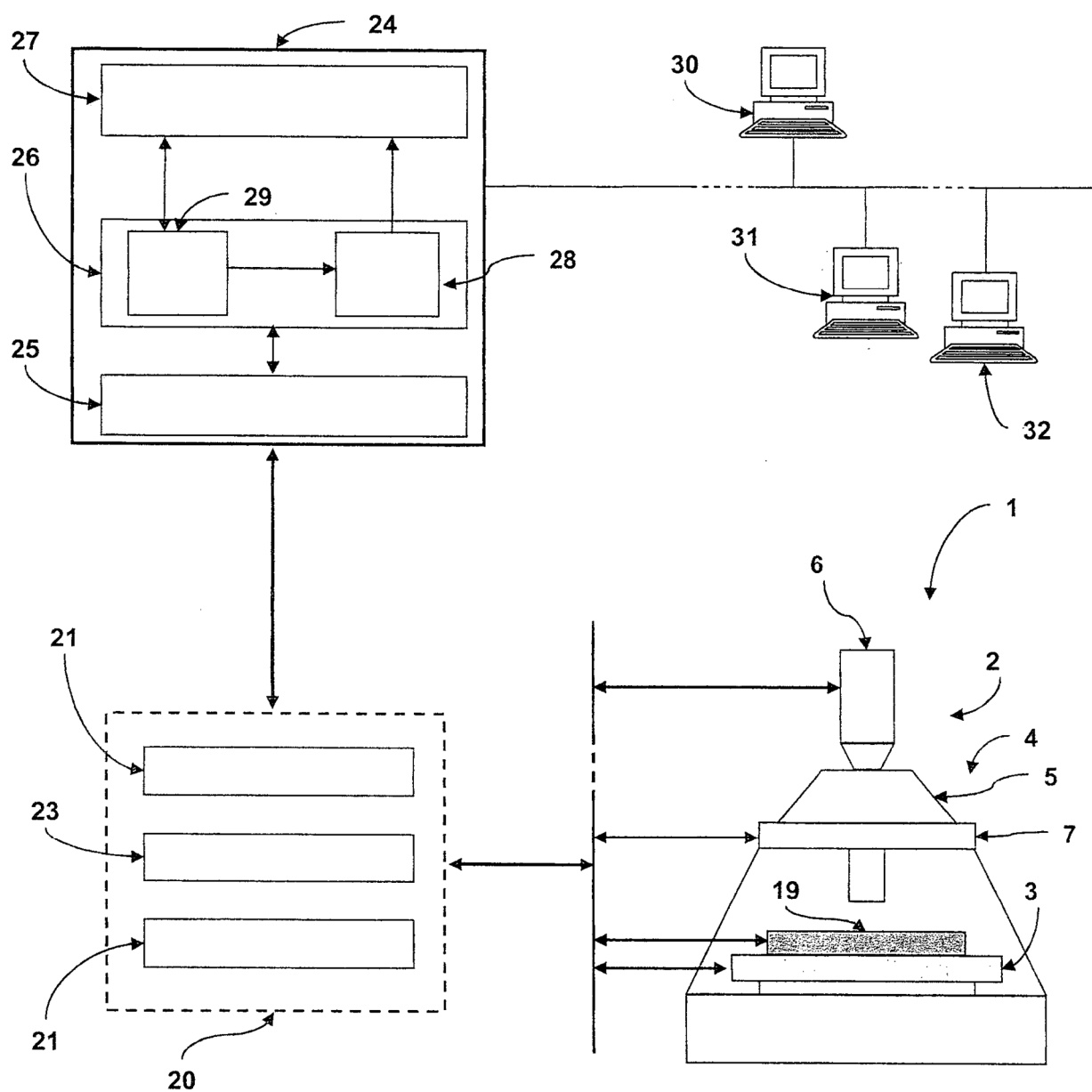


Fig. 1

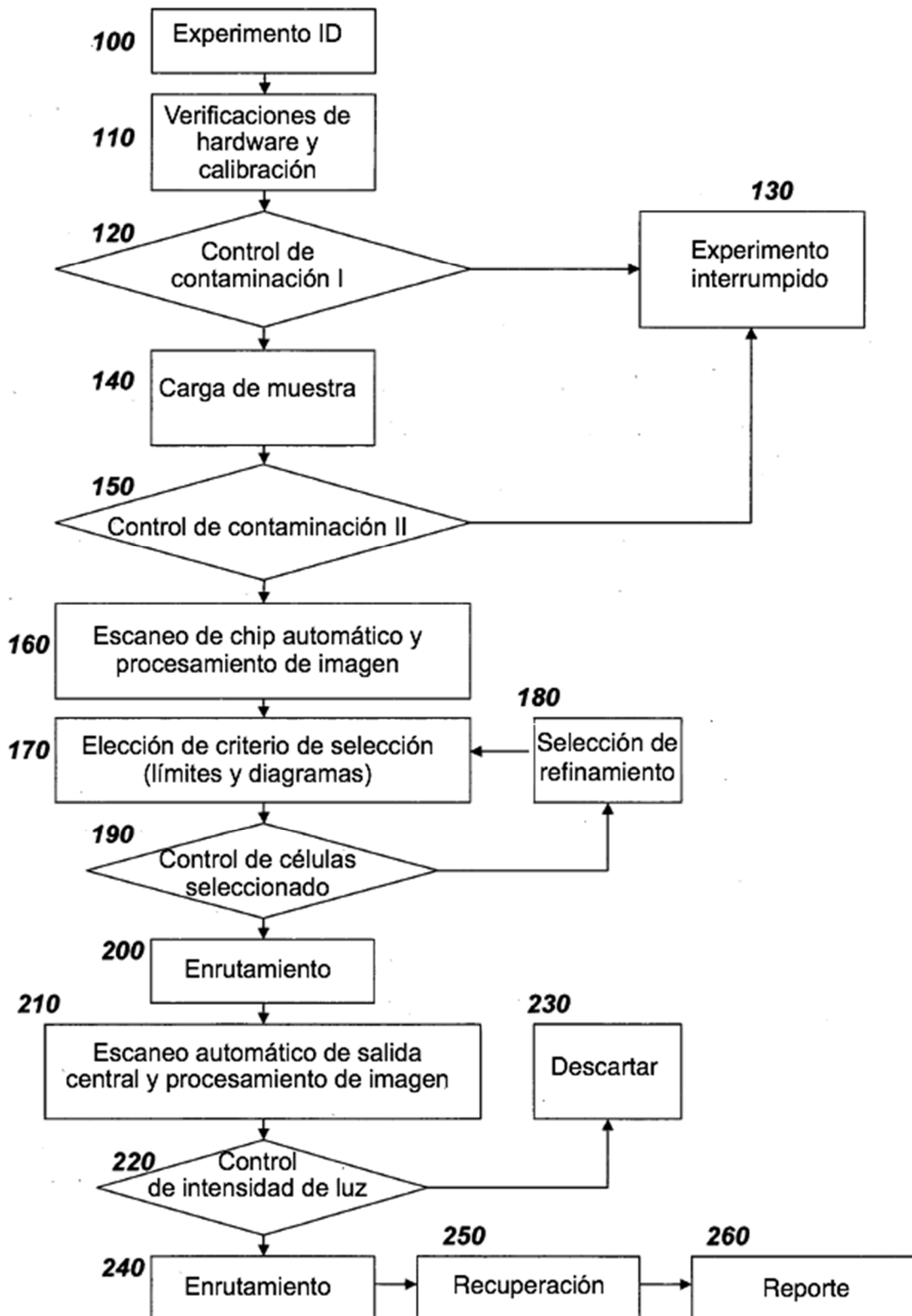


Fig. 2

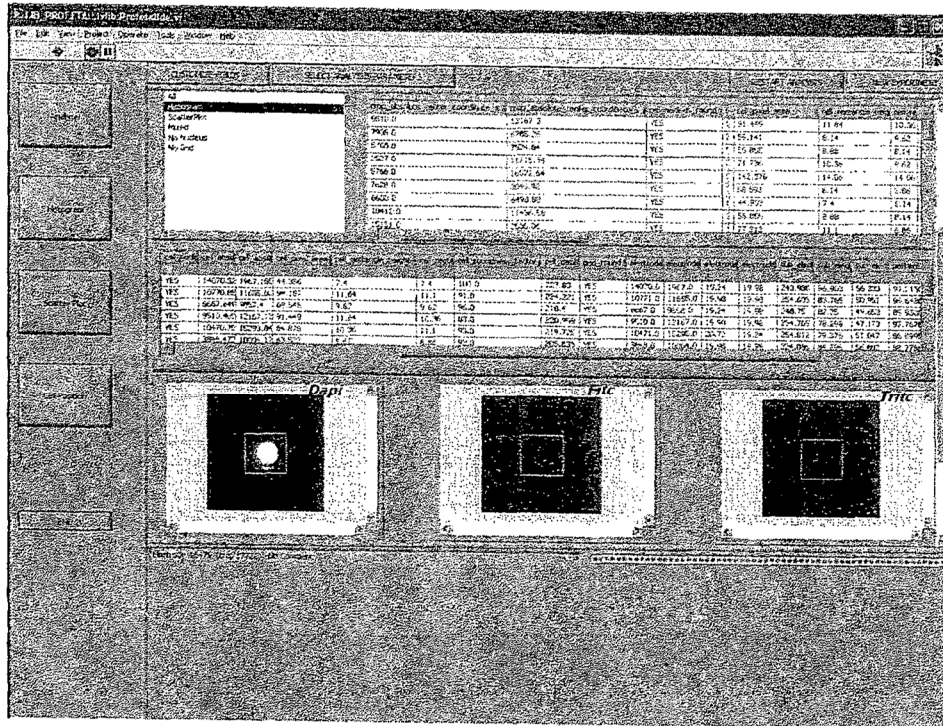


Fig. 3

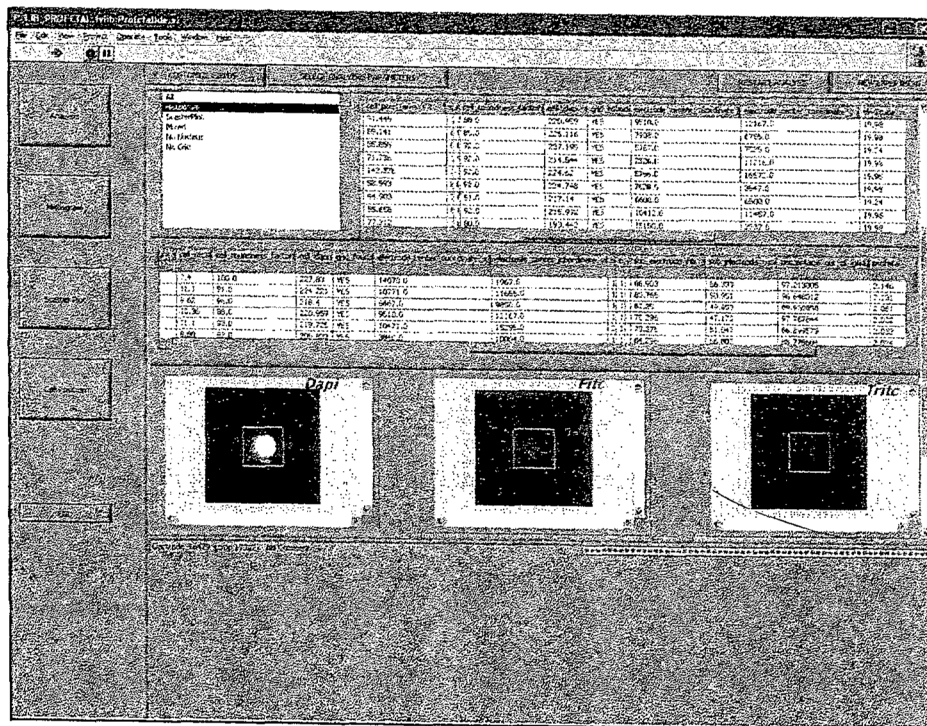


Fig. 4

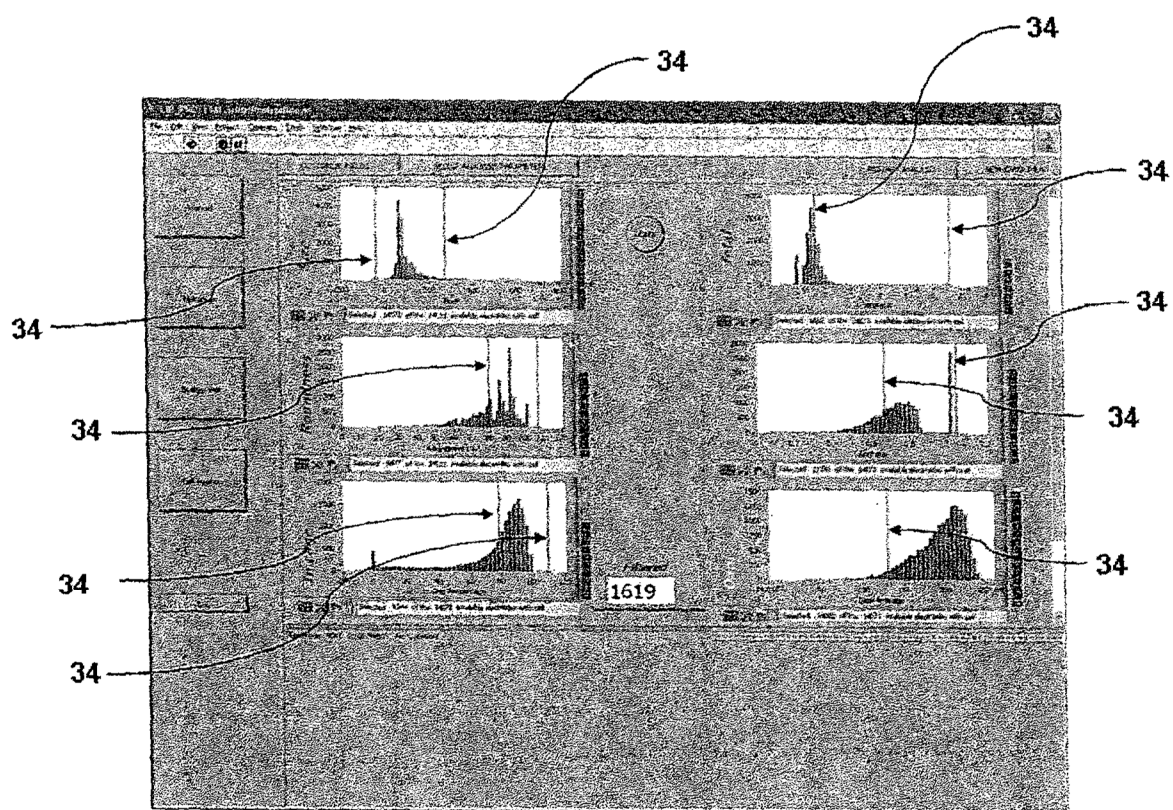


Fig. 5

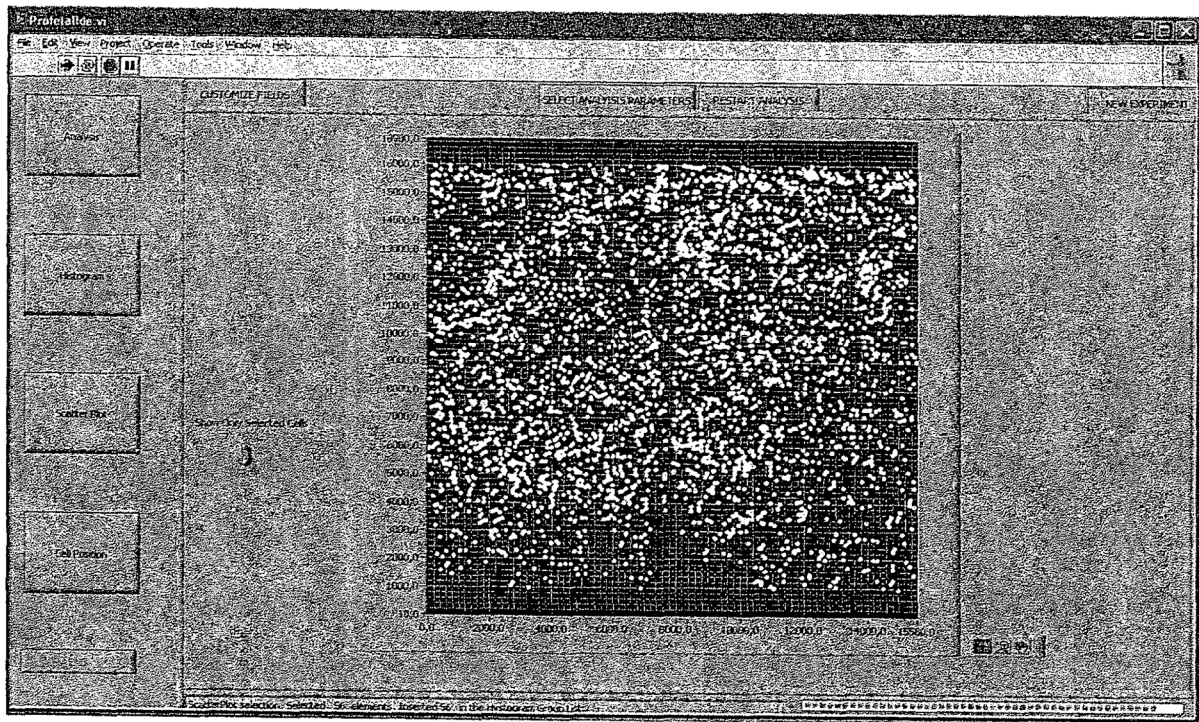


Fig. 6

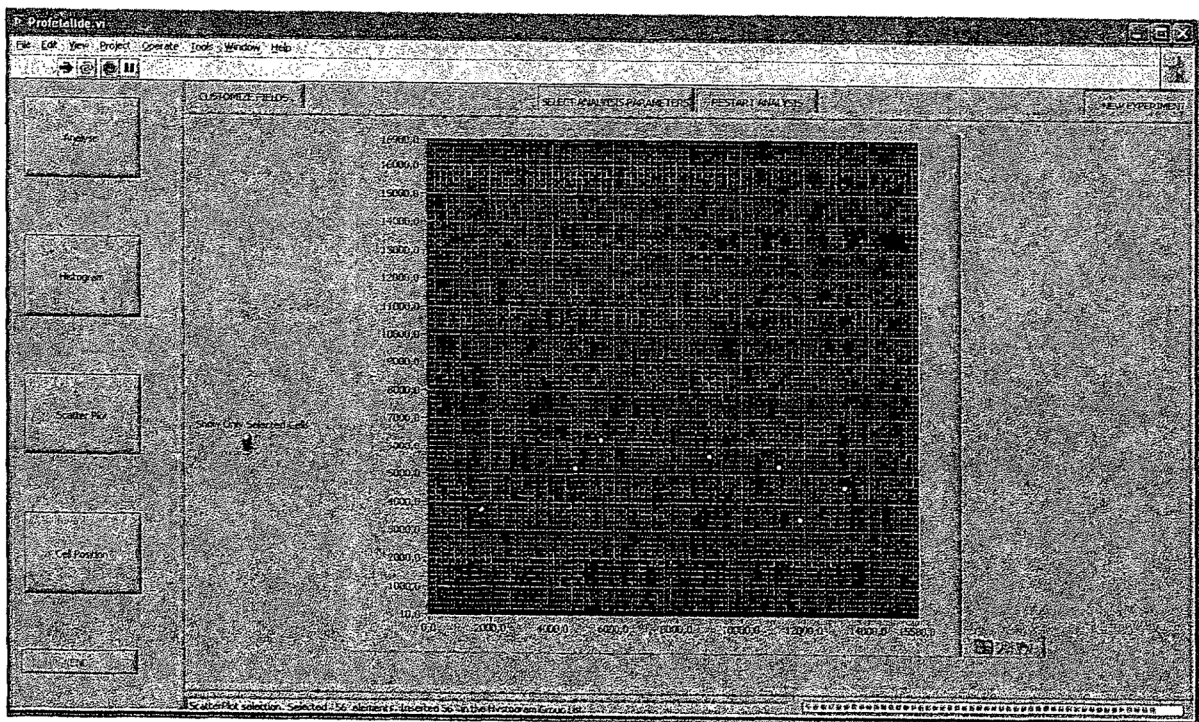


Fig. 7

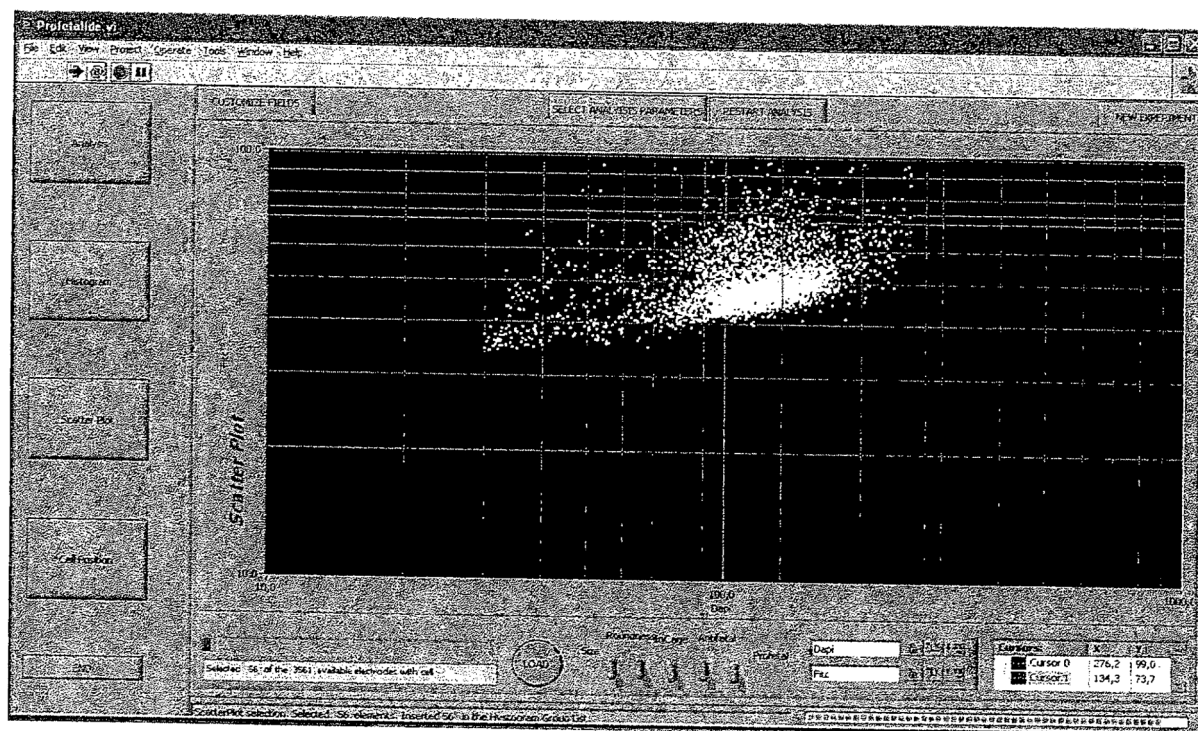
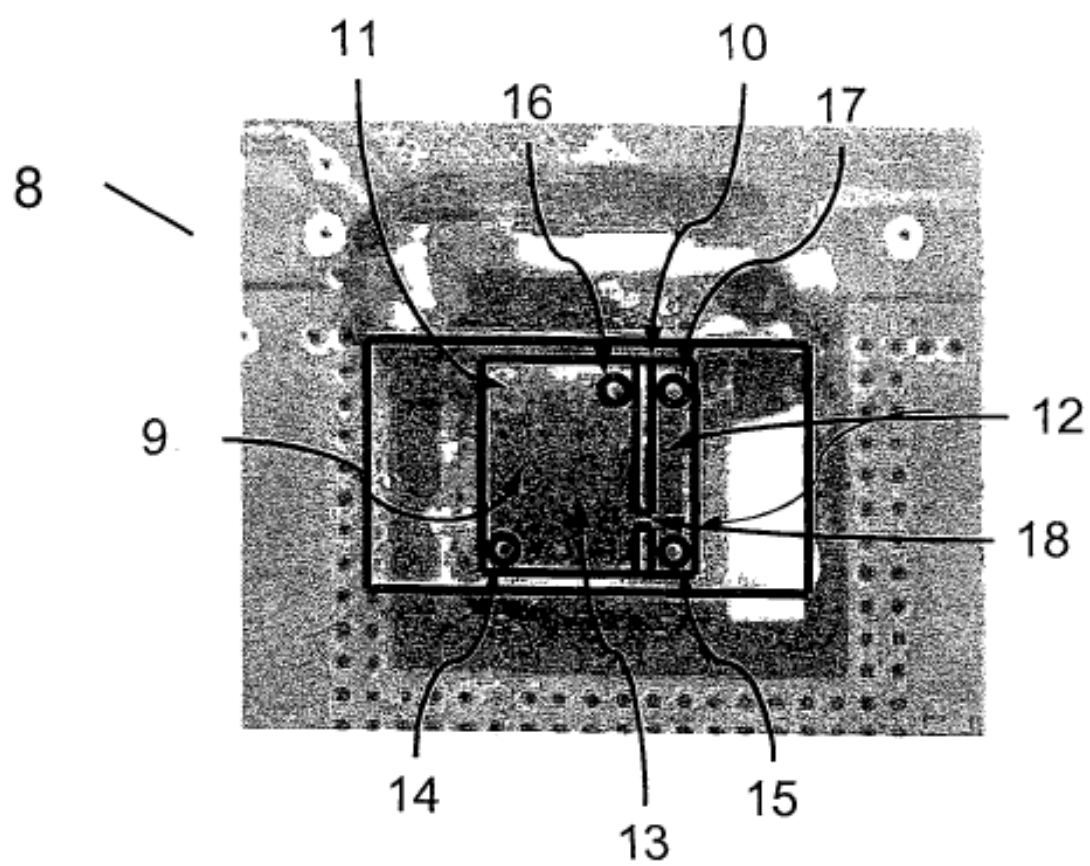


Fig. 8



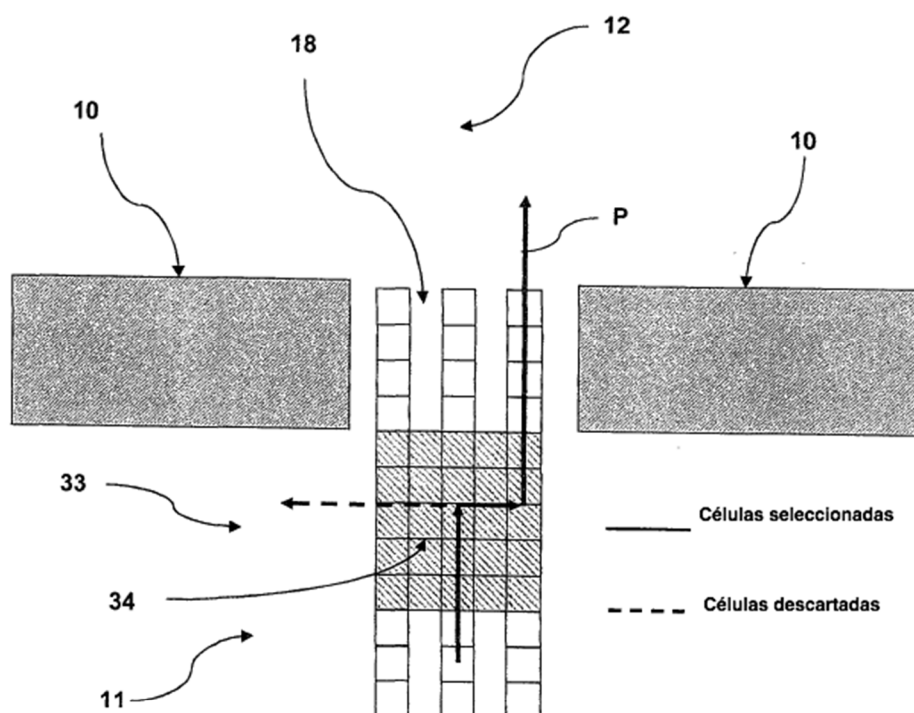


Fig. 10

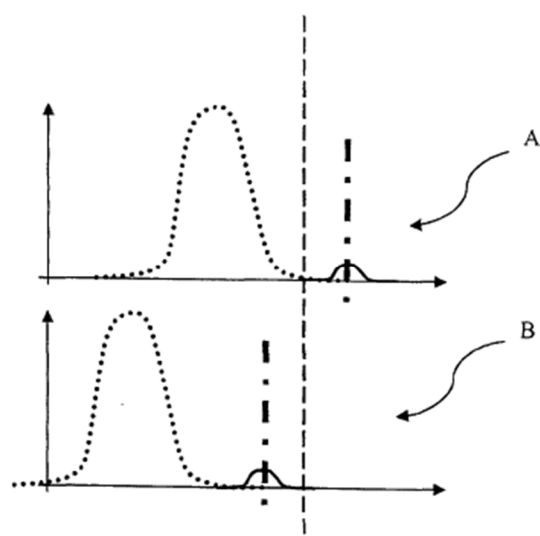


Fig. 11