

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 024 557**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/10** (2014.01)  
**G01N 15/14** (2014.01)  
**G01N 15/1429** (2014.01)  
**G01N 15/1433** (2014.01)  
**G01J 3/02** (2006.01)  
**G01J 3/44** (2006.01)  
**G01J 3/36** (2006.01)  
**G01J 3/51** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2017 PCT/US2017/036864**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017 WO17214572**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2017 E 17811122 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2025 EP 3469338**

54 Título: **Sistemas y métodos de separación celular basados en imágenes**

30 Prioridad:

**10.06.2016 US 201662348511 P**

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

**04.06.2025**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.00%)  
1111 Franklin Street, 5th Floor  
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**LO, YU-HWA;  
HAN, YUANYUAN;  
GU, YI y  
ZHANG, CE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 3 024 557 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**

Sistemas y métodos de separación celular basados en imágenes

**5 Declaración respecto a investigación o desarrollo con patrocinio federal**

Esta invención se hizo con apoyo del gobierno bajo la subvención no. 1R43DA042636-01 concedida por los Institutos Nacionales de Salud (NIH). El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

**10 Campo técnico**

Este documento de patente se refiere a sistemas, dispositivos y técnicas para separación de partículas en fluido, incluyendo dispositivos de citometría de flujo y técnicas y aplicaciones en ensayos químicos o biológicos y medidas diagnósticas.

**15 Antecedentes**

El documento WO 2012/068287 A2 divulga un sistema y método de citometría que incluye presentar un único espermatozoide a al menos una fuente de láser configurada para administrar luz al espermatozoide con el fin de inducir vibraciones de enlace en el ADN del espermatozoide, y detectar la firma de las vibraciones de enlace. La firma de vibración de enlace se usa para calcular un contenido de ADN portado por el espermatozoide que se usa para identificar el espermatozoide como portador de un cromosoma X o un cromosoma Y. Otro sistema y método puede incluir hacer fluir células por delante de al menos una fuente de QCL una por una usando un sistema de manejo de fluidos, administrando luz QCL a una única célula para inducir absorción de IR medio resonante por uno o más analitos de la célula, y detectar, usando una instalación de detección de infrarrojo medio, la luz de longitud de onda de infrarrojo medio transmitida, en donde la luz de longitud de onda de infrarrojo medio transmitida se usa para identificar una característica celular.

El documento EP 2 959 774 A1 divulga un método de crioconservación de espermatozoides que incluye las etapas de: ajustar la concentración de los espermatozoides en una solución; añadir un crioprotector y una fuente de proteína a los espermatozoides en una solución; cargar los espermatozoides en un recipiente; enfriar los espermatozoides a una temperatura de mantenimiento; mantener los espermatozoides a la temperatura de mantenimiento durante un periodo; enfriar los espermatozoides a una temperatura que se acerca a la zona de temperatura crítica, en donde la zona de temperatura crítica es una zona en la que la formación de cristales de hielo y cambios en la presión osmótica dañarían los espermatozoides; enfriar los espermatozoides a través de la zona de temperatura crítica a una velocidad de enfriamiento que es más rápida que la velocidad de enfriamiento usada para enfriar los espermatozoides desde la temperatura de mantenimiento a la temperatura que se aproxima a la zona de temperatura crítica; y sumergir los espermatozoides en nitrógeno líquido.

El documento US 2014/073000 A1 divulga un sistema para separar partículas diana de un flujo de partículas. El sistema tiene un microscopio, una fuente de luz, una cámara CCD, dispositivo de chip microfluídico con canales microfluídicos, un aparato de detección para detectar las partículas diana con características específicas predefinidas, un aparato de generación de respuesta para generar una señal en respuesta a la detección de las partículas diana, y un sistema de pinza óptica para controlar el movimiento de trampas ópticas, el sistema de pinzas ópticas está operativamente unido a la señal de respuesta.

El documento WO 2015/200857 A1 divulga un sistema y método para el análisis sin marcador de células que incluye un dispositivo de purificación configurado para recibir una población heterogénea de células, el dispositivo de purificación atrapa temporalmente en el mismo una subpoblación de células de la población heterogénea de células y un dispositivo de análisis celular colocado después del dispositivo de purificación y configurado para medir uno o más parámetros celulares incluyendo recuento celular, tamaño celular medido, y/o morfología celular. En una forma de realización alternativa, la subpoblación de células se analiza mientras están atrapadas en el dispositivo de purificación.

El documento US 2013/130226 A1 divulga un método de detectar una o más células sanguíneas enfermas en una muestra de sangre que incluye introducir una muestra de sangre en al menos una entrada de un dispositivo microfluídico que comprende uno o más canales lineales en donde cada canal tiene una longitud y una sección transversal de una altura y una anchura que definen una proporción de aspecto adaptada para aislar células sanguíneas enfermas junto con al menos una porción de la sección transversal del canal basado en deformabilidad reducida de la células sanguíneas enfermas en comparación a células sanguíneas no enfermas, en donde las células sanguíneas enfermas fluyen a lo largo de una primera porción del canal a una primera salida y las células no enfermas fluyen a lo largo de una segunda porción del canal a una segunda salida. El uno o más canales se puede adaptar para aislar células a lo largo de porciones de la sección transversal del canal basado en el tamaño celular. En algunas formas de realización, el uno o más canales pueden ser canales espirales.

El documento EP 2 169 382 A2 divulga un analizador de muestras que comprende una célula de flujo para formar un flujo de muestra, una fuente de luz para irradiar el flujo de la muestra en la célula de flujo con luz ultravioleta cercana,

y una sección de imagenología para tomar una imagen de una partícula contenida en el flujo de muestra irradiado con la luz ultravioleta cercana por la fuente de luz. También se divulga un método para analizar una muestra.

5 El documento US 2006/204071 A1 divulga simultáneamente recoger imágenes multimodales/multiespectrales de una población de células. Las características fotométricas y morfométricas identificables en las imágenes se usan para separar la población de células en subpoblaciones. Donde la población de células incluye células enfermas y células sanas, las imágenes se pueden separar en una subpoblación sana, y una subpoblación enferma. Donde la población de células no incluye células enfermas, proporciones de diferentes tipos celulares en pacientes que no tienen una condición de enfermedad se pueden comparar a las correspondientes proporciones en pacientes que tienen la condición de enfermedad, permitiendo que se detecte la condición de enfermedad. Por ejemplo, se pueden separar células sanguíneas en diferentes tipos basado en sus imágenes, y un aumento en el número de linfocitos, un fenómeno asociado con leucemia linfocítica crónica, se puede detectar fácilmente.

15 El documento US 2015/268244 A1 divulga un método para la verificación de separación de partículas que incluye recibir una primera señal de detección que está asociada con características ópticas de una partícula en un primer canal. Un canal de separación de segundos canales se determina basado en la primera señal de detección, determinando de esta manera la separación de la partícula en el canal de separación basado en las características ópticas de la partícula. Se transmite una señal de separación para separar la partícula del primer canal en el canal de separación. Se recibe una segunda señal de detección que está asociada con la presencia de la partícula en el canal de separación. La separación de la partícula del primer canal en el canal de separación se verifica basado en la segunda señal de detección.

25 El documento EP 2 602 608 A1 divulga un dispositivo para separar células biológicas sumergidas en un medio que fluye. El dispositivo comprende una unidad de imagenología holográfica que comprende elementos de imagenología holográfica, una unidad de manejo de fluido que comprende una pluralidad de canales microfluídicos para conducir el medio que fluye a lo largo del elemento de imagenología holográfica correspondiente y comprende un interruptor microfluídico organizado después de una región de imagenología en el canal microfluídico para dirigir controlablemente cada célula biológica en el medio que fluye a una salida seleccionada de una pluralidad. El dispositivo también comprende una unidad de procesamiento adaptada para caracterización en tiempo real de la imagen de difracción holográfica obtenida para cada una de las células biológicas considerando de esta manera una firma de tipo celular biológico predeterminada.

35 El documento US 2011/0222051 A1 describe un citómetro de imagenología. La luz de una fuente de luz se enfoca mediante un elemento de enfoque a puntos de iluminación enfocados en una localización sensora, iluminando una célula según la célula atraviesa la localización sensora. Una colección de lentes recoge luz que emana de la célula y reenfoca la luz recogida en un sensor de luz en matriz. El elemento de enfoque incluye una matriz de microlentes que tienen superficies esféricas. El sistema incluye una unidad de procesamiento que construye una imagen digital de la célula basado en las señales producidas por el sensor de luz en matriz que indica la intensidad y distribución de la luz que cae en el sensor de luz en matriz. El sistema caracteriza células usando luz que emana de las células por fluorescencia.

45 La citometría de flujo es una técnica para detectar y analizar partículas, tal como células vivas, según fluyen a través de un fluido. Por ejemplo, un dispositivo citómetro de flujo se puede usar para caracterizar propiedades físicas y bioquímicas de células y/o moléculas bioquímicas o grupos de moléculas basado en sus respuestas ópticas, eléctricas, acústicas, y/o magnéticas cuando se interrogan en serie. Típicamente, la citometría de flujo usa una fuente de luz externa para interrogar las partículas, de las que se detectan señales ópticas causadas por una o más interacciones entre la luz de entrada y las partículas, tal como dispersión frontal, dispersión lateral, y fluorescencia. Las propiedades medidas por citometría de flujo incluyen el tamaño relativo de una partícula, granularidad, y/o intensidad de fluorescencia.

50 La separación celular, incluyendo separación celular a nivel de célula única, se ha vuelto una característica importante en el campo de la citometría de flujo ya que los investigadores y clínicos están más interesados en estudiar y purificar ciertas células, por ejemplo, tales como células madre, células tumorales circulantes, y especies de bacterias raras. La separación celular se puede lograr por varias técnicas.

55 Los dispositivos y sistemas de citometría de flujo se pueden implementar basados en tecnologías microfluídicas para ensayos de investigación y diagnóstico, así como para aplicaciones clínicas. Un dispositivo microfluídico es un instrumento que puede controlar el comportamiento de cantidades muy pequeñas de fluido (por ejemplo, tal como nl, pl, y fl) a través de canales con dimensiones en dimensiones relativamente pequeñas, por ejemplo, el intervalo submilimétrico. Los dispositivos microfluídicos se pueden implementar para obtener una variedad de medidas analíticas incluyendo valores de difusión molecular, coeficientes de unión química, valores de pH, viscosidad de fluido, cinética de reacción molecular, etc. Los dispositivos microfluídicos se pueden construir en microchips para detectar, separar y analizar muestras biológicas, que también se puede denominar un laboratorio en un chip. Por ejemplo, un dispositivo microfluídico puede usar fluidos biológicos o soluciones que contienen células o partes celulares para diagnosticar enfermedades. Dentro de canales microfluídicos de, por ejemplo, un citómetro de flujo microfluídico, se

pueden interrogar partículas incluyendo células, perlas y macromoléculas, según sus respuestas ópticas, eléctricas, acústicas y/o magnéticas usando técnicas de citometría de flujo.

**Compendio**

5 La tecnología divulgada en este documento de patente se puede implementar para proporcionar métodos, dispositivos y sistemas para producir imágenes de partículas en un sistema de flujo, y en configuraciones específicas, la tecnología divulgada se puede usar para tomar imágenes de partículas en tiempo real y posteriormente separar partículas, incluyendo células, basado en la información espacial de la imagen. Las técnicas divulgadas se pueden aplicar para producir imágenes de células y separar células en citómetros de flujo. En aplicaciones, la tecnología divulgada se puede usar para detectar y separar células basado en la intensidad fluorescente y/o de dispersión considerando la información espacial tal como la distribución espacial de la fluorescencia.

15 En implementaciones, por ejemplo, los sistemas divulgados poseen el alto rendimiento de citómetros de flujo y la alta resolución espacial de citómetros de imagenología, en los que se producen imágenes de células a una velocidad suficientemente rápida para acomodar la separación celular en tiempo real en un sistema de flujo basado en propiedades físicas y/o fisiológicas de la célula, por ejemplo, en oposición a solo un suceso de detección.

20 En algunos aspectos, un sistema de separación de partículas basado en imágenes incluye un dispositivo de flujo de partículas estructurado para incluir un sustrato, un canal formado en el sustrato operable para flujo de células a lo largo de una dirección de flujo a una primera región del canal, y dos o más rutas de salida que se ramifican desde el canal en una segunda región próxima a la primera región en el canal; un sistema de imagenología interconectado con el dispositivo de flujo de partículas y operable para obtener datos de imágenes asociados con una célula cuando la célula está en la primera región durante el flujo a través del canal; una unidad de procesamiento y control de datos en comunicación con el sistema de imagenología, la unidad de procesamiento y control de datos incluye un procesador configurado para procesar los datos de imágenes obtenidos por el sistema de imagenología para determinar una o más propiedades asociadas con la célula de los datos de imágenes procesados y para producir un comando de control basado en una comparación de la una o más propiedades determinadas con un criterio de separación, en el que el comando de control se produce durante el flujo de la célula en el canal y es indicativo de una decisión de separación basada en uno o más atributos celulares determinados de los datos de señal de imagen que corresponden a la célula; y un accionador operativamente acoplado al dispositivo de flujo de partículas y en comunicación con el accionador, el accionador operable para dirigir la célula a una ruta de salida de las dos o más rutas de salida basado en el comando de control, en el que el sistema es operable para separar cada una de las células durante el flujo en el canal en un periodo de tiempo de 15 ms o menos desde un primer tiempo de captura de imágenes por el sistema de imagenología hasta un segundo tiempo de dirección de la partícula por el accionador.

40 En algunos aspectos, un método para separación de partículas basado en imágenes incluye obtener datos de señal de imágenes de una célula que fluye a través de un canal de un dispositivo de flujo de partículas; procesar los datos de señal de imágenes para producir un conjunto de datos de imágenes representativo de una imagen de la célula; analizar el conjunto de datos de imágenes producido para identificar una o más propiedades de la célula de los datos de imágenes procesados; evaluar la una o más propiedades identificadas de la célula con un criterio de separación para producir un comando de control para separar la célula basado en uno o más atributos celulares determinados de los datos de señal de imagen correspondientes a la célula durante el flujo de la célula en el dispositivo de flujo de partículas; y dirigir la célula a una de una pluralidad de rutas de salida del dispositivo de flujo de partículas basado en el comando de control.

50 En algunos aspectos, un dispositivo de separación de partículas basado en imágenes incluye un dispositivo de flujo de partículas estructurado para incluir un sustrato, un canal formado en el sustrato operable para el flujo de partículas a lo largo de una dirección de flujo a una primera región del canal, y dos o más rutas de salida que se ramifican desde el canal en una segunda región próxima a la primera región en el canal; un sistema de imagenología interconectado con el dispositivo de flujo de partículas y operable para obtener datos de imágenes asociados con una partícula cuando la partícula está en la primera región durante el flujo a través del canal; una unidad de procesamiento y control de datos en comunicación con el sistema de imagenología, la unidad de procesamiento y control de datos incluye un procesador configurado para procesar los datos de imágenes obtenidos por el sistema de imagenología para determinar una o más propiedades asociadas con la partícula de los datos de imágenes procesados y para producir un comando de control basado en una comparación de la una o más propiedades determinadas con un criterio de separación, y un accionador operativamente acoplado al dispositivo de flujo de partículas y en comunicación con el accionador, el accionador operable para dirigir la partícula a una ruta de salida de las dos o más rutas de salida basado en el comando de control, en el que el sistema es operable para separar cada una de las partículas durante el flujo en el canal en un periodo de tiempo de 15 ms o menos desde un primer tiempo de captura de imágenes por el sistema de imagenología hasta un segundo tiempo de dirección de la partícula por el accionador.

65 En algunos aspectos, un método para separación basado en imágenes de una partícula incluye obtener datos de señal de imágenes de una partícula que fluye a través de un canal de un dispositivo de flujo de partículas; procesar los datos de señal de imágenes para producir un conjunto de datos de imágenes representativo de una imagen de la partícula; analizar el conjunto de datos de imágenes producido para identificar una o más propiedades de la partícula de los

datos de imágenes procesados; producir un comando de control evaluando la una o más propiedades identificadas con un criterio de separación; y dirigir la partícula a una de una pluralidad de rutas de salida del dispositivo de flujo de partículas basado en el comando de control.

- 5 Los anteriores y otros aspectos de la tecnología divulgada y sus implementaciones y aplicaciones se describen en mayor detalle en los dibujos, la descripción y las reivindicaciones.

**Breve descripción de los dibujos**

- 10 La figura 1A muestra un diagrama de una forma de realización de ejemplo de un sistema de separación de partículas basado en imagen según la tecnología divulgada.

La figura 1B muestra un diagrama de bloques de una forma de realización de ejemplo de una unidad de procesamiento y control de datos de un sistema de separación de partículas basado en imagen según la tecnología divulgada.

- 15 Las figuras 2A-2C muestran diagramas de una forma de realización de ejemplo de un sistema microfluídico de separación celular basado en imagen según la tecnología divulgada.

- 20 Las figuras 3A y 3B muestran datos de imágenes capturadas y procesadas de ejemplo de señales PMT para producir imágenes de células para técnicas de separación de partículas basadas en imágenes según la tecnología divulgada.

Las figuras 4A-4C muestran diagramas de una forma de realización de ejemplo de procesos de métodos de separación de partículas basados en imágenes según la presente tecnología.

- 25 La figura 4D muestra un gráfico de brillo-tiempo que representa una implementación de un proceso de detección de células de ejemplo basado en el procesamiento de una señal PMT de tiempo-dominio asociada con una única célula que viaja a través del área de iluminación de un sistema de ejemplo según la presente tecnología.

- 30 La figura 5A muestra un diagrama de una implementación de ejemplo de un proceso para determinar una característica o características identificada(s) de una célula detectada para separación celular basada en imágenes.

La figura 5B muestra un gráfico de datos que representa los resultados de una implementación de una técnica de reconstrucción de imagen de ejemplo según la presente tecnología.

- 35 La figura 6 muestra un gráfico de datos que representa la señal de intensidad de fluorescencia para una célula basada en una reconstrucción de imagen de ejemplo.

La figura 7 muestra un ejemplo de una imagen reconstruida de una célula.

- 40 Las figuras 8A y 8B muestran imágenes de microscopio de fluorescencia de ejemplo de células transfectadas, pero no tratadas con fármaco y células transfectadas y tratadas con fármaco.

- 45 Las figuras 9A y 9B muestran imágenes celulares de fluorescencia de ejemplo tomadas por el sistema separador de células basado en imágenes de células transfectadas, pero no tratadas con fármaco y células transfectadas y tratadas con fármaco.

La figura 10 muestra un histograma del área de fluorescencia calculada de ejemplo de todos los sucesos y de las células separadas de una implementación de ejemplo.

- 50 La figura 11 muestra un diagrama de una forma de realización de ejemplo de un sistema microfluídico de separación celular basado en imagen según la tecnología divulgada.

La figura 12 muestra un diagrama de flujo de una implementación de procesamiento de imágenes de ejemplo usando el sistema mostrado en la figura 11.

- 55 La figura 13A muestra un diagrama de flujo que representa datos de ejemplo mediante las etapas de procesamiento de imágenes de ejemplo mostradas en la figura 12.

- 60 La figura 13B muestra un gráfico de distribución de ejemplo para subconjuntos usando una técnica de características operativas de receptor (ROC) de ejemplo para evaluar parámetros extraídos tal como parámetros de morfología celular.

- 65 Las figuras 14A y 14B muestran imágenes celulares de células sin translocar y células translocadas, respectivamente, capturadas por el sistema de ejemplo y reconstruidas por técnicas de reconstrucción de imágenes de ejemplo según la tecnología divulgada.

La figura 15 muestra un ejemplo de un hiperplano que muestra la separación de dos conjuntos de células para implementaciones de criterios de separación celular.

5 Las figuras 16A y 16B muestran imágenes celulares de células sin translocar y células translocadas, respectivamente, capturadas por el sistema de ejemplo, mediante un microscopio.

10 Las figuras 17A y 17B muestran imágenes celulares de células en fase G1 y células en fase G2/M, respectivamente, capturadas por el sistema de ejemplo y reconstruidas por técnicas de reconstrucción de imágenes de ejemplo según la tecnología divulgada.

La figura 18 muestra un ejemplo de un hiperplano que muestra separación de dos conjuntos de células para implementaciones de criterios de separación celular.

15 Las figuras 19A y 19B muestran imágenes celulares de células en fase G1 y células en fase G2/M, respectivamente, capturadas por el sistema de ejemplo y reconstruidas por técnicas de reconstrucción de imágenes de ejemplo según la tecnología divulgada.

20 La figura 20 muestra un diagrama de flujo de una implementación de procesamiento de imágenes de ejemplo para separación basada en el número de perlas unidas en la membrana celular de células implementadas por el sistema mostrado en la figura 11.

La figura 21 muestra ejemplos de imágenes celulares en escala de grises procesadas por un módulo de procesamiento de imágenes de ejemplo con diferente número de perlas.

25 La figura 22 muestra un histograma del área de imagen de perlas para diferente número de perlas.

### Descripción detallada

30 Algunos dispositivos y sistemas de citómetros de flujo existente detectan y separan células basado en la intensidad de fluorescencia y/o dispersión sin considerar la información espacial tal como la distribución espacial de fluorescencia. Ha habido algunos avances en el desarrollo de técnicas para producir imágenes de células para citómetros de flujo con alto rendimiento y alta resolución espacial. Sin embargo, la imagen celular no se ha producido a una velocidad suficientemente rápida para ser útil para aplicaciones, en particular para separación celular en un sistema de flujo, por ejemplo, debido a la cantidad requerida de computación para generar la imagen celular. Como tal, el estado de la técnica existente para capacidades de separación celular son sistemas de "detección solo", y no pueden "cribar" las células detectas basado en criterios significativos y matizados.

40 En aplicaciones, la tecnología divulgada se puede implementar de modos específicos en forma de métodos, sistemas y dispositivos para la separación celular basada en imágenes en citometría de flujo usando (a) adquisición de imágenes en tiempo real de células que viajan rápido por técnicas de procesamiento de datos eficaces utilizando algoritmos matemáticos implementados con FPGA y/o GPU y concurrente (b) técnicas de "selección" basadas en características espaciales de las partículas según los criterios de separación de las imágenes adquiridas en tiempo real. A diferencia de los citómetros de flujo tradicionales que usan intensidades fluorescentes de biomarcadores elegidos como criterios para la separación celular, los métodos, sistemas y dispositivos según la tecnología divulgada permiten varios criterios de selección de poblaciones definidos por el usuario que contienen características espaciales.

50 Los ejemplos de criterios de selección basados en imágenes incluyen el contorno celular, tamaño celular, forma celular, tamaño y forma de estructuras celulares internas tal como el núcleo celular, patrones fluorescentes, distribución de color fluorescente, etc. Por ejemplo, los usuarios pueden dibujar las células que quieren separar y el sistema ejecutará en consecuencia. Con tales capacidades únicas, los usuarios tal como investigadores pueden seguir muchos procesos biológicos importantes mediante la localización de ciertas proteínas en los dominios y subdominios citosólico, nuclear o de membrana celular. Puesto que cada población celular tiene algún grado de heterogeneidad a nivel genómico (por ejemplo, mutaciones, epigenética) o medioambiental (por ejemplo, división asimétrica, gradiente de morfógenos), se prevé que la identificación y extracción de células individuales según sus características espaciales únicas contribuya significativamente a los campos de inmunología, heterogeneidad tumoral, diferenciación de células madre, y análisis de neuronas.

60 En algunas formas de realización, un sistema de separación de partículas basado en imágenes incluye un dispositivo de flujo de partículas, tal como una célula de flujo o un dispositivo microfluídico, integrado con un accionador de separación de partículas; un sistema de imagenología óptica de alta velocidad y alta sensibilidad; y un sistema electrónico de control de procesamiento y separación de imagen celular en tiempo real. Por ejemplo, un objetivo de los métodos, sistemas y dispositivos divulgados es realizar el proceso entero de (i) captura de imagen de una partícula (por ejemplo, una célula), (ii) reconstrucción de característica de imagen de una señal de tiempo-dominio, y (iii) tomar una decisión de separación de partículas y operación de separación por el accionador con una latencia de menos de 65 15 ms para cumplir las necesidades para separación de partículas en tiempo real. En algunas implementaciones descritas en el presente documento, la latencia total es menor de 8 ms (por ejemplo, 7,8 ms), en algunas

implementaciones, la latencia total es menor de 6 ms (por ejemplo, 5,8 ms), y en algunas implementaciones, la latencia total es menor de 3,5 ms (por ejemplo, 3,3 ms). Para implementaciones de separación celular, por ejemplo, los métodos, sistemas y dispositivos divulgados son capaces de realizar imágenes, analizar y separar células por características de imagen específicas a ciclos de vida, localización de proteínas, localización de genes, daños al ADN, y otras propiedades celulares, que se pueden conectar a diferentes enfermedades o patógenos.

La figura 1A muestra un diagrama de una forma de realización de ejemplo de un sistema de separación de partículas basado en imagen 100 según la presente tecnología. El sistema 100 incluye un dispositivo de flujo de partículas 110, un sistema de imagenología 120 interconectado con el dispositivo de flujo de partículas 110, una unidad de procesamiento y control de datos 130 en comunicación con el sistema de imagenología 120, y un accionador 140 en comunicación con la unidad de procesamiento y control de datos 130 y operativamente acoplado al dispositivo de flujo de partículas 110. El dispositivo de flujo de partículas 110 está estructurado para incluir un canal 111 en el que las partículas fluyen a lo largo de una dirección de flujo a un área de interrogación 115 donde se obtienen datos de imágenes por el sistema de imagenología 120 para cada partícula en el área de interrogación 115. La unidad de procesamiento y control de datos 130 está configurada para procesar los datos de imágenes y determinar una o más propiedades asociadas con la partícula para producir un comando de control para la separación de la partícula. El comando de control se proporciona al accionador 140, que está interconectado con el dispositivo de flujo de partículas 110 en un área de separación del dispositivo 110, de modo que el accionador opera para separar la partícula particular a un canal de salida correspondiente al comando de control. El sistema 100 implementa la separación basada en imágenes de las partículas en tiempo real, en que el sistema de imagenología 120 toma imagen de una partícula en el área de interrogación y el accionador 140 la separa en el área de separación en tiempo real y basado en una propiedad determinada analizada por la unidad de procesamiento y control de datos 130.

El sistema 100 es programable por un usuario para separar cada partícula basado en criterios definidos por el usuario que se pueden asociar con una o más de una pluralidad de propiedades mostradas por cada partícula individual analizada en tiempo real por la unidad de procesamiento y control de datos 130. Algunos criterios definidos por el usuario de ejemplo incluyen, pero no están limitados a, una cantidad y/o tamaño de subcaracterísticas de o en la partícula individual (por ejemplo, subpartículas unidas a células vivas, incluyendo partículas engullidas por células o unidas a células); morfología de la partícula individual; y/o tamaño de la partícula individual. De esta manera, el sistema 100 es capaz de evaluar y separar partículas por propiedades, tal como propiedades de células vivas, incluyendo separación por funcionalidades fisiológicas celulares (por ejemplo, absorción de partícula o sustancia por una célula, o atrapamiento de la partícula por una célula), por daños celulares, por localización de proteínas, o por otras propiedades celulares.

La figura 1B muestra un diagrama de bloques de una forma de realización de ejemplo de la unidad de procesamiento y control de datos 130. En varias implementaciones, la unidad de procesamiento y control de datos 130 está incorporada en uno o más dispositivos informáticos personales, por ejemplo, incluyendo un ordenador de sobremesa o portátil, uno o más dispositivos informáticos en un sistema de ordenadores o red de comunicación accesible a través de Internet (denominado "la nube") incluyendo servidores y/o bases de datos en la nube, y/o uno o más dispositivos informáticos móviles, tal como un teléfono inteligente, tableta o dispositivo informático vestible incluyendo un reloj inteligente o gafas inteligentes. La unidad de procesamiento y control de datos 130 incluye un procesador 131 para procesar datos, y memoria 132 en comunicación con el procesador 131 para almacenar y/o tamponar datos. Por ejemplo, el procesador 131 puede incluir una unidad procesadora central (CPU) o una unidad microcontroladora (MCU). En algunas implementaciones, el proceso 131 puede incluir una matriz de puerta programable en el campo (FPGA) o una unidad de procesamiento gráfico (GPU). Por ejemplo, la memoria 132 puede incluir y almacenar código ejecutable por el procesador, que cuando es ejecutado por el procesador 131, configura la unidad de procesamiento y control de datos 130 para que realice varias operaciones, por ejemplo, tal como recibir información, comandos, y/o datos, procesar información y datos, tal como desde el sistema de imagenología 120, y transmitir o proporcionar información/datos procesada a otro dispositivo, tal como el accionador 140. Para apoyar varias funciones de la unidad de procesamiento y control de datos 130, la memoria 132 puede almacenar información y datos, tal como instrucciones, software, valores, imágenes, y otros datos procesados o referenciados por el procesador 131. Por ejemplo, se pueden usar varios tipos de dispositivos de memoria de acceso aleatorio (RAM), dispositivos de memoria de lectura solo (ROM), dispositivos de memoria flash, y otros medios de almacenamiento adecuados para implementar las funciones de almacenamiento de la memoria 132. En algunas implementaciones, la unidad de procesamiento y control de datos 130 incluye una unidad de entrada/salida (I/O) 133 para interconectar el procesador 131 y/o memoria 132 a otros módulos, unidades o dispositivos. En algunas formas de realización, tal como para dispositivos informáticos móviles, la unidad de procesamiento y control de datos 130 incluye una unidad de comunicación inalámbrica, por ejemplo, tal como un transmisor (Tx) o una unidad de transmisor/receptor (Tx/Rx). Por ejemplo, en tales formas de realización, la unidad I/O 133 puede interconectar el procesador 131 y la memoria 132 con la unidad de comunicación inalámbrica, por ejemplo, utilizar varios tipos de interfaces inalámbricas compatibles con estándares de comunicación de datos típicos, que se pueden usar en comunicaciones de la unidad de procesamiento y control de datos 130 con otros dispositivos, por ejemplo, tal como entre uno o más ordenadores en la nube y el dispositivo usuario. Los estándares de comunicación de datos incluyen, pero no están limitados a, Bluetooth, Bluetooth de baja energía (BLE), Zigbee, IEEE 802.11, red de área local inalámbrica (WLAN), red de área personal inalámbrica (WPAN), red de área ancha inalámbrica (WWAN), WiMAX, IEEE 802.16 (interoperabilidad mundial para acceso de microondas (WiMAX)), métodos de comunicación celular 3G/4G/LTE, e interfaces paralelas. En algunas implementaciones, la unidad de

procesamiento y control de datos 130 puede interconectarse con otros dispositivos usando una conexión por cable a través de la unidad I/O 133. La unidad de procesamiento y control de datos 130 también puede interconectarse con otras interfaces externas, fuentes de almacenamiento de datos, y/o dispositivos visualizadores visuales o de audio, etc. para recuperar y transferir datos e información que se pueden procesar por el procesador 131, almacenar en la memoria 132, o mostrar en una unidad de salida de un dispositivo visualizador o un dispositivo externo.

Las figuras 2A-2C muestran diagramas de un sistema microfluídico de separación celular basado en imagen 200 según algunas formas de realización del sistema de separación de partículas basado en imágenes 100. El sistema 200 incluye un dispositivo microfluídico 210 para que fluyan partículas a través de un canal de interrogación óptico para separación, un sistema de imagenología 220 para obtener datos de imágenes de las partículas en un área de iluminación del canal de interrogación, un sistema de procesamiento y control de datos 230 para procesar los datos de imágenes obtenidos en tiempo real y determinar un comando de separación, y un accionador 240 para seleccionar las partículas en el dispositivo microfluídico 210 basado en el comando de separación determinado.

Como se muestra en la figura 2A y la figura 2C, el dispositivo microfluídico 210 estructurado para incluir un sustrato 213 que tiene un paso que forma un canal de muestra microfluídico 211, y canales de envuelta microfluídicos 212 que convergen en el canal de muestra 211. En implementaciones, por ejemplo, el canal de muestra está configurado para llevar partículas (por ejemplo, células) suspendidas en un fluido que fluye en una dirección de flujo, y los canales de envuelta 212 están configurados para proporcionar flujo de envuelta del fluido para enfocar hidrodinámicamente las partículas suspendidas en el fluido antes de fluir a través de un área de iluminación 215 del dispositivo microfluídico 210. En algunas formas de realización, por ejemplo, el sustrato 213 puede estar formado en un material a granel, por ejemplo, tal como polidimetilsiloxano (PDMS), que está unido a un sustrato base, por ejemplo, un sustrato base de vidrio o sustrato base de otro material.

El sistema de imagenología 220 del sistema 200 incluye una fuente de luz 221, por ejemplo, un láser, para proporcionar una luz de entrada o sonda en el área de iluminación 215 del dispositivo microfluídico 210, y un generador de imágenes óptico 222 para obtener imágenes de las partículas iluminadas en el área de iluminación 215. El generador de imágenes óptico de ejemplo 222, como se muestra en la figura 2A, incluye una lente objetivo 223 (por ejemplo, de un microscopio u otro dispositivo de imagenología óptico) ópticamente acoplado a un filtro espacial (SF) 224, un filtro de emisión (EF) 225, y un tubo fotomultiplicador (PMT) 226. En algunas implementaciones, por ejemplo, el sistema de imagenología 220 incluye uno o más elementos de guía de luz 229 para dirigir la luz de entrada al área de iluminación 215 del dispositivo microfluídico 210. En el ejemplo mostrado en la figura 2A, el elemento guía de luz 229 incluye un espejo dicróico organizado con la fuente de luz 221 y el generador de imágenes óptico 222 para dirigir la luz de entrada al área de iluminación 215.

En algunas implementaciones del sistema de imagenología 220, la fuente de luz 221 (por ejemplo, el láser) está configurada para producir una señal de excitación fluorescente que es incidente sobre el área de iluminación 215 para producir una emisión fluorescente por las partículas. El generador de imágenes óptico 222 captura la señal de emisión fluorescente de salida óptica de modo que se puede generar una imagen de la partícula.

El sistema de procesamiento y control de datos 230 del sistema 200 está configurado en comunicación con el generador de imágenes óptico 222, por ejemplo, a través del PMT, para procesar rápidamente las partículas captadas y producir un control de separación basado en la imagen procesada de cada partícula captada en tiempo real. En algunas implementaciones de la unidad de procesamiento y control de datos 230, una unidad de procesamiento FPGA está configurada para procesar rápidamente los datos de la señal de imagen recibidos por el generador de imágenes óptico 222. Un ejemplo de tal implementación incluye una plataforma FPGA Virtex-II (xc2v3000) junto con un compilador Xilinx 10.0, que se puede proporcionar a través de un chasis Crio-9104 de National Instrument para ejecutar algoritmos según métodos de procesamiento de datos de la presente tecnología.

El accionador 240 del sistema 200 está configurado en comunicación con el sistema de procesamiento y control de datos en tiempo real 230 para seleccionar la partícula que fluye en un área de selección 217 del canal de muestra 211 en dos o más canales de salida 218 del dispositivo microfluídico. En algunas formas de realización, por ejemplo, la distancia entre el área de iluminación 215 y el área de selección 217 puede estar en un intervalo de 50  $\mu\text{m}$  a 1 mm. En implementaciones, el accionador 240 recibe el comando de separación del sistema de procesamiento y control de datos 230 en tiempo real, de modo que el sistema de imagenología 220 y el sistema de procesamiento y control de datos 230 operan para capturar y procesar la imagen de cada partícula mientras fluye a través del área de iluminación 215 de modo que el accionador 240 recibe y ejecuta el comando de separación para seleccionar cada partícula en consecuencia. Por ejemplo, en algunas implementaciones, el accionador 240 incluye un accionador piezoeléctrico acoplado al sustrato 213 para producir desviación que produce que la partícula se mueva en una dirección de partícula en el área de selección 217 que dirige la partícula a lo largo de una trayectoria a uno de los dos o más canales de salida 218.

En implementaciones del sistema 200, por ejemplo, las células individuales suspendidas están hidrodinámicamente enfocadas en el canal microfluídico por el flujo de envuelta, asegurando que las células viajan en el centro del canal fluido a una velocidad uniforme. Una emisión de fluorescencia es detectada por el PMT 226 en una configuración de microscopio de fluorescencia de campo amplio, tal como en el ejemplo mostrado en la figura 2A. En este ejemplo,

para acomodar la geometría del dispositivo microfluídico, el haz láser se introduce a la interrogación óptica en reflexión de 52 grados por un espejo dielectrico (DM) miniatura 229 colocado delante de una lente objetivo 50x 223 (por ejemplo, con NA = 0,55, distancia de trabajo = 13 mm).

5 La figura 2B muestra una forma de realización de ejemplo del filtro espacial (SF) 225 que se inserta en la ruta de detección a la derecha en el plano de la imagen del generador de imágenes óptico 222 del sistema de imagenología 220. El diseño del filtro espacial incluye un patrón que tiene una pluralidad de hendiduras separadas. En algunas formas de realización, por ejemplo, el filtro espacial 225 incluye un patrón de aberturas que tienen dimensiones uniformes, en que el patrón de aberturas codifica una forma de onda en la luz recibida por el generador de imágenes óptico. En el ejemplo mostrado en la figura 2B, el patrón incluye diez hendiduras de 100 μm por 50 μm de modo que una está inmediatamente después de otra. En algunas formas de realización, por ejemplo, el filtro espacial 225 incluye un patrón de aberturas que tienen una dimensiones longitudinal y transversal variables con respecto a la dirección de flujo a través del canal microfluídico, de modo que una forma de onda está codificada por el generador de imágenes óptico para permitir la detección óptica de una posición de una partícula en al menos dos dimensiones en el área de iluminación 215 del canal microfluídico 211. Un ejemplo de un filtro espacial bidimensional espacialmente variable se proporciona en la patente en EE UU No. 9.074.978 B2 titulada "TÉCNICA DE CODIFICACIÓN ESPACIO-TIEMPO ÓPTICA EN DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS".

20 Con referencia de nuevo a la figura 2A, aunque el sistema de imagenología 220 muestra solo un PMT para la detección de señal fluorescente, se entiende que se pueden añadir más PMT al generador de imágenes óptico 222 y, si es necesario, añadir más haces láser de excitación a la fuente de luz 221, para producir imágenes de células fluorescentes multicolor.

25 El sistema de procesamiento y control de datos en tiempo real 230 incluye un sistema en bucle de control que se implementa usando una matriz de puerta programable en campo (FPGA) para procesar las imágenes capturadas y producir los correspondientes comandos de separación para cada partícula. El sistema de procesamiento y control de datos 230 incluye algoritmos de procesamiento de imágenes y separación de partículas basado en imagen ejecutables por la FPGA para proporcionar generación de imagen automatizada y separación precisa por el sistema 200. Por ejemplo, una vez se toma una decisión de separación por el algoritmo FPGA, el accionador de plomo-circonato-titanato (PZT) piezoeléctrico integrado en el chip de ejemplo 240 se acciona para aplicar presión fluidica en la estructura de boquilla en la unión de separación. En algunas implementaciones, el actuador PZT de ejemplo 240 está configurado para ejecutar la operación de desplazamiento de fluido en respuesta al comando de separación en un periodo de tiempo de o menor de 0,1 ms por operación. Por ejemplo, el desplazamiento de fluido por el accionador PZT en menos de 0,1 ms muestra capacidades de manipulación hidrodinámica de célula individual con un alto rendimiento.

35 Otros ejemplos de características de un dispositivo de flujo de partículas y/o un accionador que se pueden usar en formas de realización de ejemplo de los dispositivos, sistemas y métodos según la tecnología divulgada se proporcionan en la patente en EE UU No. 9.134.221 B2 titulada "DISPOSITIVOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO FLUÍDICOS Y DETECCIÓN DE PARTÍCULAS BASADO EN CODIFICACIÓN DE SEÑAL". Otros ejemplos de características de un sistema de imagenología óptica que se pueden usar en formas de realización de ejemplo de los dispositivos, sistemas y métodos según la tecnología divulgada se proporcionan en la solicitud de patente en EE UU No. 15/514.930 que es una Solicitud de Fase Nacional en EE UU presentada bajo 35 U.S.C. § 371 basada en la solicitud PCT No. PCT/US2015/053368 titulada "CITOMETRÍA DE FLUJO DE IMAGENOLÓGIA USANDO TRANSFORMACIÓN ESPACIAL-TEMPORAL" y publicada como WO2016/054293A1.

45 Las figuras 3A y 3B muestran resultados de ejemplo de una señal PMT y la imagen celular de fluorescencia construida de la señal PMT, procesada por el sistema de procesamiento y control de datos 230 de ejemplo, usando un algoritmo de ejemplo descrito en la figura 4 y ejecutado por la FPGA de ejemplo. La figura 3A muestra una señal de salida de PMT de tiempo-dominio de ejemplo de luz fluorescente de una célula A549 teñida con CellTrace CFSE. La figura 3B muestra la imagen de fluorescencia procesada correspondiente (por ejemplo, redimensionada) que representa el tamaño real de la célula. Las regiones numeradas segmentadas por líneas discontinuas en las figuras demuestran la correspondencia entre la señal tiempo-dominio y la imagen resultante. El tamaño está marcado en la figura 3B.

55 La resolución espacial de la imagen restablecida en la dirección x (transversal) depende del número de las hendiduras en el filtro espacial, y en la dirección y (viaje celular) depende de la velocidad de muestreo y velocidad de flujo celular. En la imagen original restablecida por el citómetro de flujo de imagenología (mostrada en la figura 3B), el tamaño de pixel efectivo es 2 μm en la dirección x y aproximadamente 0,4 μm en la dirección y. La imagen recuperada representa un área de 20 μm por 20 μm en el plano objeto en el canal microfluídico.

60 La figura 4A muestra un diagrama de una forma de realización de ejemplo de un método 400 para separación basada en imágenes de partículas. Las implementaciones del método 400 se pueden realizar por las varias formas de realización del sistema de separación de partículas basado en imágenes 100 según la presente tecnología, tal como el sistema 200 y el sistema 1100.

65 El método 400 incluye un proceso 405 para capturar datos de imágenes, por el sistema de imagenología 120, de una partícula que fluye a través de un canal en el dispositivo de flujo de partículas 110, por ejemplo, en el área de

interrogación 115. Por ejemplo, el proceso 405 puede incluir capturar continuamente imágenes a una velocidad predeterminada o velocidades variables, que se puede basar en la velocidad de flujo de la partícula en el canal. En algunas implementaciones, el proceso 405 incluye recibir, en un controlador del sistema de imagenología 120, un comando de captura de imágenes de la unidad de procesamiento y control de datos 230 para efectuar el protocolo de captura de imágenes para obtener datos de imágenes. Por ejemplo, la unidad de procesamiento y control de datos 130 puede cambiar uno o más parámetros del protocolo de captura de imágenes ejecutado por el sistema de imagenología 120 en implementaciones en tiempo real del sistema.

La velocidad de captura de imagen se puede asociar con el volumen de datos de partículas individuales. Por ejemplo, el sistema puede determinar la velocidad de captura de imágenes y/u otros parámetros del protocolo de captura de imágenes basado al menos en parte en (a) la velocidad de flujo de partícula del dispositivo de flujo de partículas 110 y (b) la velocidad de muestreo electrónico, por ejemplo, dependiendo en qué resolución se desea, que se puede usar para determinar el volumen de datos de partículas individuales. La velocidad de captura de imágenes se puede asociar con las capacidades de registro/computación de datos de la unidad de procesamiento y control de datos 130 y/o un controlador (por ejemplo, procesador) del sistema de imagenología 120. Por ejemplo, una mayor velocidad de conversión de analógico a digital (ADC) y mayor memoria pueden aumentar la velocidad de captura de imágenes. El protocolo de captura de imágenes que incluye captura de imágenes y parámetros de procesamiento se puede seleccionar basado al menos en parte en el del diseño del filtro espacial, por ejemplo, como en algunas implementaciones la salida óptica del filtro espacial puede afectar el procesamiento de la complejidad del algoritmo. Notablemente, factores ópticos, tal como aumentos, filtros ópticos, modo de imagenología, etc., típicamente tienen poca, si alguna, influencia en la velocidad de captura de imágenes, pero son significativos en obtener los datos de entrada que se procesan para producir los resultados globales, por ejemplo, determinación de las propiedades de las partículas que se evalúan para determinar una decisión de separación u otros análisis.

El método 400 incluye un proceso 410 para recibir los datos de imágenes, en la unidad de procesamiento y control de datos 130 y desde el sistema de imagenología 120, en que los datos recibidos se asocian con una partícula captada por el sistema de imagenología 120 que fluye en el canal del dispositivo de flujo de partículas 110. Por ejemplo, en algunas implementaciones del proceso 410, la unidad de procesamiento y control de datos 130 recibe datos de señal de dominio de tiempo, por ejemplo, intensidad óptica, de uno o más PMT del sistema de imagenología 120 para cada partícula captada en el área de iluminación en el dispositivo de flujo de partículas 110. El método 400 incluye un proceso 420 para procesar los datos (por ejemplo, datos de señal de imagen) para producir un conjunto de datos de imágenes representativo de una imagen de la partícula captada por el sistema de imagenología 120. Por ejemplo, en algunas implementaciones del proceso 420, los datos de señal de imagen recibidos se preprocesan filtrando los datos, reconstruyendo una imagen basada en los datos filtrados usando un algoritmo de reconstrucción de imagen según la presente tecnología, y/o redimensionando la imagen reconstruida, por ejemplo, en que la imagen reconstruida se convierte a datos de imagen binaria. El método 400 incluye un proceso 430 para analizar el conjunto de datos de imagen producido para identificar una o más características de la partícula captada basado en criterios predeterminados y para determinar un comando de separación basado en la una o más características identificadas. En algunas implementaciones del método, el método 400 incluye un proceso 415 para primero procesar los datos de señal de imagen recibidos para detectar la presencia de la partícula en el área de iluminación, y después procesar los datos según el proceso 420 para producir el conjunto de datos de imagen que posteriormente se analiza según el proceso 430. El método 400 incluye un proceso 440 para proporcionar el comando de separación al accionador 140. El método 400 incluye un proceso 445 para ejecutar, mediante el accionador 140, el comando de separación para dirigir la partícula que fluye en el área de separación del canal del dispositivo de flujo de partículas 110 al correspondiente canal de salida del dispositivo 110. Por ejemplo, en implementaciones del método 400, el sistema de imagenología 120 y el sistema de procesamiento y control de datos 230 implementan los procesos 405 y 410, 420, 430, y 440, respectivamente, en tiempo real, de modo que el accionador 140 recibe y ejecuta el comando de separación para dirigir las partículas en consecuencia, por ejemplo, seleccionar cada partícula al canal de salida apropiado del dispositivo 110, en un periodo de tiempo diminuto desde la captura de imagen (proceso 405) a la actuación de la selección de partículas (proceso 445). Por ejemplo, en algunas implementaciones del proceso 445, el accionador 140 incluye un accionador piezoeléctrico acoplado al dispositivo de flujo 110 para producir desviación hidrodinámica en el fluido que produce que la partícula se mueva en una dirección de partícula a lo largo de una trayectoria deseada para entrar en el canal de salida deseado.

En algunas formas de realización, la unidad de procesamiento y control de datos 130 incluye módulos de software correspondientes a uno o cualquier combinación de los procesos 410, 420, 430 y 440 almacenados en la memoria 132 y ejecutable por el procesador 131 para implementar los procesos 410, 420, 430 y/o 440. La figura 4B muestra un diagrama de módulos de procesamiento de datos de ejemplo de los sistemas según la presente tecnología. Por ejemplo, la unidad de procesamiento y control de datos 130 puede incluir un módulo Detección de Partícula 461, un módulo Procesar Imagen 463, y un módulo Tomar una Decisión de Separación 465. Como se muestra en el ejemplo de la figura 4B, una vez una partícula (por ejemplo, célula) se detecta al implementar los algoritmos ejecutables por el módulo Detección de Partícula 461, la unidad de procesamiento y control de datos 130 procede a implementar el módulo Procesar Imagen 463 si una partícula (por ejemplo, célula) se detecta, de otra manera, vuelve a mantener imágenes de registro, por ejemplo, a través de lectura de PMT. Al extraer parámetros de imágenes de células y comparar esos valores a criterios de separación predefinidos, por ejemplo, realizado por el módulo Procesar Imagen 463, el módulo Tomar una Decisión de Separación 465 se implementa para determinar si desencadenar el accionador

140 o no. En algunas formas de realización, la unidad de procesamiento y control de datos 130 incluye un módulo Registrar Imagen 467 para controlar, al menos parcialmente, el sistema de imagenología 120 para implementar el proceso 405, por ejemplo, que puede incluir iniciar y/o adaptar el protocolo de captura de imagen o ajustes del sistema de imagenología. Por ejemplo, en algunas implementaciones tal como con el generador de imágenes 222, cuando el módulo Registrar Imagen 467 es operable para controlar el registro de la lectura de PMT en una cierta longitud.

En algunas implementaciones, los parámetros asociados con las propiedades de la partícula (por ejemplo, propiedades de la célula) se extraen basado en el tipo de parámetro o parámetros que se van a extraer. Por ejemplo, para diferentes parámetros de morfología, el proceso para extraer los parámetros asociados con propiedades morfológicas de la célula puede incluir al menos algunas de las siguientes técnicas. El proceso puede incluir analizar el área de imagen, por ejemplo, incluyendo determinar el número de píxeles con valor "1" en la imagen binaria. El número de píxeles es área de imagen. El proceso puede incluir analizar el perímetro, por ejemplo, incluyendo determinar el número de píxeles en el contorno de la imagen, por ejemplo, según se detecta el contorno de la imagen. El proceso puede incluir analizar el diámetro en la dirección x, por ejemplo, incluyendo (por ejemplo, en una imagen binaria) determinar el número de píxeles "1" en cada fila que representa la dirección x. Por ejemplo, se puede determinar el mayor recuento como el diámetro en la dirección x. El proceso puede incluir analizar el diámetro en la dirección y, por ejemplo, incluyendo (por ejemplo, en una imagen binaria) determinar el número de píxeles "1" en cada columna que representa la dirección y. Por ejemplo, se puede determinar el mayor recuento como el diámetro en la dirección y.

La figura 4C muestra un diagrama de una implementación de ejemplo del proceso 430, por ejemplo, implementación del módulo Detección de Partícula 461, para detectar células para separación celular basada en imagen. En algunas implementaciones, por ejemplo, el módulo Detección de Partícula 461 busca una sección de la señal PMT de tiempo-dominio que ha integrado la intensidad de fluorescencia, denominada en el presente documento "brillo", que es mayor que un umbral preestablecido. Por ejemplo, en algunas implementaciones, la velocidad a que viaja la célula en la célula de flujo o dispositivo microfluídico es 0,08 m/s, y se usa una velocidad de muestreo de 200 kHz, de modo que el algoritmo de separación de partículas y procesamiento de imágenes integra cada 500 puntos de datos consecutivos para obtener el valor de brillo. Cada vez que el brillo es mayor que un primer umbral preestablecido, por ejemplo, *umbral1*, esto significa que una célula entra en el campo de visión del sistema óptico en el plano de la imagen. El algoritmo determina la derivada de tiempo del brillo, que entonces se compara a un segundo umbral preestablecido, por ejemplo, *umbral2*. Si la derivada de tiempo es menor que *umbral2*, el algoritmo considera que la célula está bien dentro del campo de visión, y el proceso de ejemplo 430 sigue para determinar una característica o características identificadas de la célula detectada, por ejemplo, la implementación del módulo Procesar Imagen 463 se inicia consiguientemente.

La figura 4D muestra un gráfico de brillo-tiempo que representa una implementación de un proceso de detección de células de ejemplo basado en el procesamiento de una señal PMT de tiempo-dominio asociada con una única célula que viaja a través del área de iluminación del sistema. Como se muestra en el gráfico, se detecta que una célula entra en el área de imagen (por ejemplo, área de interrogación 115) basado en un umbral (por ejemplo, brillo  $\geq 1,0$ ) solo después del marcador de tiempo de 1,176 s, y el sistema captura los datos de señal de imagen hasta que se detecta que la célula sale del área de imagen basado en el umbral (por ejemplo, brillo  $\leq 1,0$ ) después del marcador de tiempo de 1,179 s.

La figura 5A muestra un diagrama de una implementación de ejemplo del proceso 430, por ejemplo, implementación del módulo Procesar Imagen 463, para determinar una característica o características identificada(s) de la célula detectada para separación celular basada en imágenes. En el ejemplo en la figura 5A, el proceso 420 se implementa después de algunos aspectos del proceso 430, por ejemplo, en particular después del análisis de los datos de señal de imagen para determinar si una célula se detecta o no. Por ejemplo, en algunas implementaciones como se muestra en la figura 5A, después del análisis parcial de los datos de señal de imagen recibidos para determinar la presencia de una célula, el módulo Procesar Imagen 463 preprocesa los datos de señal de imagen (por ejemplo, señal PMT tiempo-dominio) incluyendo filtrar u otras técnicas de procesamiento de señales. Por ejemplo, en algunas implementaciones, los datos de señal de imagen recibidos se filtran a bajo paso para eliminar el ruido de alta frecuencia. En algunos ejemplos, se usa una ventana hamming de 10<sup>o</sup> orden para filtrar a bajo paso, que es un ejemplo de un filtro de bajo paso particular aplicable. El módulo Procesar Imagen 463 puede implementar otras características del proceso 420 incluyendo técnicas de reconstrucción de imagen (por ejemplo, basado en un algoritmo de ejemplo descrito en el presente documento, incluyendo la ecuación (1)) para convertir la señal tiempo-dominio a una imagen que representa distribución espacial bidimensional de la fluorescencia de las células. Después de eso, la imagen de la célula reconstruida se redimensiona para fines de fidelidad y se convierte a una imagen binaria. Para imágenes binarias, por ejemplo, una técnica de filtro abierto opcional se aplica para eliminar el ruido espurio, y el módulo Procesar Imagen 463 detecta una o más características celulares (por ejemplo, detección de la pared o membrana celular) después de aplicar el filtro abierto. En algunas implementaciones, el filtro abierto se puede aplicar después de detectar la(s) característica(s) celular(es). El módulo Procesar Imagen 463 extrae parámetros basado en las características celulares detectadas que describe aspectos de la célula, tal como morfología celular, que se pueden comparar a los valores de los criterios de separación preestablecidos del usuario para la posterior determinación del comando de separación (por ejemplo, comando de selección).

Las implementaciones de ejemplo del método 400 usando el sistema 200 se describen posteriormente para un estudio de ejemplo que demuestra separación celular basada en imágenes. En el estudio de ejemplo, el sistema de imagenología 220 incluía un láser de 488 nm 100 mW (por ejemplo, iBeam-SMART, Toptica) que tiene una forma de haz oval con distribución de energía gaussiana, que está colimado, enfocado, y después expandido para iluminar un área de 100 μm (dirección x) por 250 μm (dirección y) para formar el área de iluminación 215 en el dispositivo microfluídico 210. La fluorescencia que pasa el espejo dicróico miniatura con longitud de onda de corte de 500 nm (por ejemplo, ThorLabs) y la luz dispersa se recogieron a través de una lente objetivo 50x, 0,55NA (por ejemplo, Mituyojo). La señal de intensidad de luz en cada canal se adquirió por un PMT (por ejemplo, H9307-02, Hamamatsu).

Las técnicas de reconstrucción de imagen implementadas por el módulo Procesar Imagen 463, por ejemplo, se usaron para transformación espacial a temporal de los datos de imagen que se puede formular matemáticamente en lo siguiente:

$$S(t) = \int_{x,y} Célula(x, y - Mvt) \cdot F(x, y) \cdot I(x, y) dx dy \quad (1)$$

donde  $S(t)$  es la señal PMT medida,  $Célula$  es el perfil de intensidad de fluorescencia o dispersión celular bidimensional,  $F(x, y)$  es la función característica del filtro espacial,  $I(x, y)$  es el perfil de intensidad de la iluminación láser,  $y$  es a lo largo de la dirección de viaje de la célula y  $x$  es a lo largo de la dirección transversal, y  $M$  es el factor de aumento del sistema óptico perteneciente al citómetro de flujo. Según viaja la célula en el canal microfluídico a una velocidad  $v$ , la imagen proyectada en el filtro espacial, por ejemplo, el SF de ejemplo 224 mostrado en la figura 2B, viaja a una velocidad efectiva de  $Mv$ . En el caso más sencillo para explicar el principio y resolver para  $Célula$  en la ecuación (1), se puede elegir que  $F(x, y)$  sea una serie de hendiduras pequeñas (por ejemplo, hendiduras rectangulares de 100 μm por 50 μm) representada aproximadamente en la ecuación (2) y que  $I(x, y)$  sea una constante de un haz láser de intensidad uniforme (es decir, perfil de haz sombrero de copa):

$$F(x, y) = \sum_{q=1}^N \delta(x - q) \cdot \delta(y - qL) \quad (2)$$

donde  $x = 1, 2, \dots, N$  es el número de fila en el filtro espacial,  $L$  es la distancia entre dos hendiduras que transmite fluorescencia. Como resultado, por ejemplo, la imagen celular se puede construir de la siguiente relación:

$$Célula(x, y) = S\left(\frac{xL - y}{v}\right) \quad (3)$$

Una técnica de reconstrucción de imagen de ejemplo que puede implementar el módulo Procesar Imagen 463, por ejemplo, incluye determinar dos variables: el número de puntos de muestreo en cada pico, y el punto inicial de los datos de señal de imagen tiempo-dominio (por ejemplo, señal PMT) para la célula que fluye. Por ejemplo, puesto que las células no viajan a velocidad perfectamente uniforme, el número de puntos de muestreo en cada pico cambia ligeramente; y puesto que la velocidad de viaje de la célula, así como la posición de la célula en el área imagen cambian ligeramente (por ejemplo, área de imagen de 20 μm por 20 μm ajustada basado en el filtro espacial de ejemplo), el punto inicial de la lectura PMT tiempo-dominio también cambia. En la técnica de reconstrucción de imagen de ejemplo,  $m$  se denomina el punto de partida de la lectura PMT,  $n$  se denomina el número puntos en cada pico. Basado en la variación de velocidad de la célula, por ejemplo,  $n$  varía de 46 a 51. Según esto,  $m$  varía de 0 a 519-10n. La técnica de reconstrucción de imagen de ejemplo barre  $m$  y  $n$  para asegurar la mejor combinación para reconstruir la imagen celular. El sumatorio de las intensidades en el punto inicial de cada pico se calcula para cada combinación en el barrido, por ejemplo. La combinación con el menor sumatorio es la respuesta correcta para la reconstrucción de la imagen. Después de calcular  $m$  y  $n$ , se pueden usar para reconstruir imágenes tanto de campo claro como de fluorescencia ya que las señales registradas por ambos PMT están sincronizadas. La técnica de reconstrucción de imagen de ejemplo calcula valores basado en la ecuación (4),

$$(m, n) = \left\{ (m, n) \left| \min \sum_{i=0}^{19} \sum_{j=0}^{519-10n} FIFO_{pmt1}[m + i \times n] \right. \right\} \quad (4)$$

La figura 5B muestra un gráfico de datos de ejemplo que representa los resultados de una implementación de la técnica de reconstrucción de imagen, por ejemplo, que muestra resultados de ejemplo de la búsqueda para la mejor combinación de punto inicial y número de puntos de muestreo para cada pico. Los símbolos "\*" negros mostrados en el gráfico de datos representan puntos iniciales de cada pico encontrados por el algoritmo de reconstrucción.

En general, con el filtro espacial descrito anteriormente (por ejemplo, filtro espacial 224 de la figura 2B) insertado en el plano de la imagen, la fluorescencia de diferentes partes de la célula pasará diferentes hendiduras en diferentes tiempos. Como resultado, la forma de onda de la señal fluorescente del PMT incluye una secuencia de patrones separados en el dominio de tiempo, y cada sección de la señal en el dominio de tiempo corresponde a la señal fluorescente generada por cada pauta particular de la célula. Después de recibir el patrón de intensidad de luz sobre cada hendidura, la imagen celular de la célula entera se puede construir empalmando todo el perfil junto. En la forma

de realización de ejemplo del sistema 200 mostrado en las figuras 2A-2C, el filtro espacial contiene diez hendiduras rectangulares de 100  $\mu\text{m}$  por 50  $\mu\text{m}$  colocadas en secuencia. Con una lente objetivo de 50 $\times$  ( $M = 50$ ), por ejemplo, el diseño del filtro permite la construcción de la imagen fluorescente o de dispersión de una célula que viaja, por ejemplo, no mayor de 20  $\mu\text{m}$  por 20  $\mu\text{m}$ , usando el algoritmo que incluye la ecuación (3), que requiere una cantidad mínima de computación y es adecuado para clasificación y separación celular basada en imagen en tiempo real, de alto rendimiento. Por ejemplo, usando una lente objetivo de 50 $\times$ /0,55NA, velocidad de muestreo de 500 kHz para adquirir señal PMT, y velocidad de viaje de la célula de 0,2 m/s que está dada por velocidad de flujo de la muestra de 12  $\mu\text{l}/\text{min}$  y velocidad de flujo de envuelta de 120  $\mu\text{l}/\text{min}$ , el tamaño efectivo del pixel en la dirección y es  $\frac{L}{\left(\frac{L}{Mv}\right) \times R} = \frac{Mv}{R} = 0,4 \mu\text{m}$

que es menor que el criterio de Rayleigh, produce de esta manera una resolución limitada por difracción en la dirección y. Aquí R es la velocidad de muestreo de la lectura PMT en este cálculo. Se indica que se pueden usar otros parámetros de implementación, tal como: célula que viaja a velocidad de aproximadamente 8 cm/s (por ejemplo, dada por la velocidad de flujo); área de imagen ajustada para que sea 20  $\mu\text{m}$  por 20  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, lectura PMT basada en imagen de fluorescencia de 10 picos); velocidad de muestreo de 200 kmuestras/s, de modo que cada pico incluye 50 puntos de muestreo.

Para el estudio de ejemplo, el diseño del filtro espacial se dibujó en AutoCAD y se imprimió a una máscara de transparencia a 20.000 puntos por pulgada (dpi). Una capa de barniz fotorresistente negativo (por ejemplo, NR9-1500PY, Futurrex, Inc) se hilo a 3.000 rotaciones por minuto (rpm) en una oblea de vidrio de 6 pulgadas. La oblea se calentó en una placa caliente a 150°C durante 3 minutos después se expuso a luz UV (por ejemplo, EVG620NT, EV Group) a través de la máscara de transparencia. Después de la exposición a UV, la oblea se coció a 100°C durante otros 3 minutos antes de revelar en RD6 (por ejemplo, Futurrex, Inc) durante 12 segundos. Una película de aluminio de 200 nm se pulverizó sobre la oblea de vidrio. Después de despegar el metal, los patrones del filtro espacial se formaron y la oblea de vidrio se troceó en trozos de 15 mm por 15 mm. Para ayudar a mantener el filtro espacial en el sistema de citómetro de flujo, el filtro espacial que tiene diez hendiduras de 50  $\mu\text{m}$  por 100  $\mu\text{m}$  se montó a un portamuestras fabricado por un método de impresión 3D.

Para el estudio de ejemplo, muestras de células de riñón embrionario humano HEK293T se transfectaron con plásmidos pEGFP-GR (por ejemplo, Addgene). Después de cultivo continuo durante 3 días, se añadió dexametasona (por ejemplo, Sigma-Aldrich) 1  $\mu\text{M}$  al medio de cultivo. Después de incubación durante 60 minutos, las células HEK293T se recogieron, fijaron por paraformaldehído al 4%, lavaron y resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X. Antes de cada experimento de imagenología, la suspensión se diluyó en PBS a una concentración de 200 células/ $\mu\text{l}$ .

La forma de realización de ejemplo del sistema de separación celular basado en imagen 200 usado en el estudio de ejemplo incluía una máscara espacial que incluye 10 hendiduras y utilizó una velocidad de flujo celular de aproximadamente 0,08 m/s. El área de imagen se ajustó para que fuera 20  $\mu\text{m}$  por 20  $\mu\text{m}$ . En este diseño, la señal PMT de la fluorescencia de una célula parece ser 10 picos separados, y el número de puntos de muestreo de cada pico es aproximadamente 50. Sin embargo, la velocidad de diferentes células no es perfectamente uniforme, de modo que el número de puntos de muestreo para cada célula cambia ligeramente, y el punto inicial de cada pico también necesita ser determinado. Como tal, los algoritmos de procesamiento de datos se configuraron para explicar tales velocidades celulares variables, es decir, para buscar el punto inicial y el número de puntos de muestreo para cada pico en un cierto intervalo, de modo que la imagen celular se pueda reconstruir con éxito. Basado en las variaciones en la velocidad de flujo celular, el número de puntos de muestreo de cada pico típicamente varió de 46 a 51. Así el número total de puntos en la imagen celular es desde 460 a 510. Para cada célula, una vez que el módulo Detección de Partícula 461 determinó que venía una célula, se registró la señal PMT en una longitud de 520 puntos de muestreo. Por ejemplo, para asegurar la mejor combinación de punto inicial y número de puntos de muestreo para cada pico, el algoritmo barrió el número puntos de muestreo de 46 a 51 y puntos iniciales de cada pico en consecuencia. Para cada combinación en el barrido, se calculó la suma de las intensidades de todos los puntos iniciales, y la combinación con el menor sumatorio se eligió como la respuesta correcta para reconstrucción de imagen.

La figura 6 muestra un gráfico de datos que representa la señal de intensidad de fluorescencia para una célula basada en una reconstrucción de imagen de ejemplo. El resultado de ejemplo es indicativo de la búsqueda de la mejor combinación de punto inicial y número de puntos de muestreo para cada pico.

La figura 7 muestra un ejemplo de una imagen reconstruida de una célula, por ejemplo, en que se usó el criterio para determinar los límites de una célula usando área fluorescente para producir la imagen de la célula. Para el filtro abierto, que es una erosión seguida por una dilatación, se usó una vecindad de 3 por 3. En la etapa de detección de pared o membrana celular, todos los píxeles en una imagen celular binaria se escanean. Para los píxeles que tiene intensidad no cero, el algoritmo de ejemplo comprobó los nueve píxeles en su vecindad 3 por 3. Al contar sus píxeles vecinos que tienen intensidades no cero, por ejemplo, si el número contado es mayor que 0 y menor que 8, este pixel se determinó como un pixel en la pared o membrana celular.

La técnica de ejemplo se implementó al menos en parte usando una FPGA. La tabla 1 muestra los resultados de latencia aproximada redondeados para cada etapa en la implementación de ejemplo del algoritmo de procesamiento de datos, en que la latencia total está por debajo de 3,3 ms. El algoritmo de procesamiento de datos de ejemplo es

flexible para implementarse en múltiples plataformas, incluyendo en paralelo. Por ejemplo, utilizando el poder de procesamiento paralelo de la unidad de procesamiento gráfico (GPU), el algoritmo también se puede implementar en GPU, por ejemplo, o bien por la arquitectura CUDA de Nvidia o la OpenCL de AMD. El algoritmo de separación de imagen tiene un tiempo de carrera mucho más corto combinando el poder de procesamiento paralelo de GPU, de modo que el rendimiento de separación se mejora más. Aunque la formulación de producir imágenes celulares se describe en forma de métodos de ejemplo en este documento de patente, cabe señalar que el algoritmo puede de alguna manera ser diferente cuando se usan diferentes diseños de filtro espacial que la previamente descrita máscara espacial de 10 hendiduras. El procedimiento de trabajo global del sistema, sin embargo, permanece igual.

La tabla 1 muestra los datos de ejemplo que representan el rendimiento de los módulos en el diseño FPGA de ejemplo, por ejemplo, en que las latencias se representan en tiempo (ms).

Tabla 1

	Latencia (ms)
Filtro de bajo paso	0,6
Reconstruir imagen	0,4
Redimensionar imagen	0,8
Filtro abierto	0,9
Detectar pared celular	0,4
Extraer parámetros de morfología celular (por ejemplo, área celular)	0,2
Total	3,3

Se describen los resultados de separación de ejemplo del estudio de ejemplo. Por ejemplo, para demostrar la viabilidad del sistema separador celular basado en imágenes en tiempo real de ejemplo, se realizaron pruebas de separación en una mezcla de células que poseen citoplasma fluorescente y células que poseen núcleo fluorescente. Las células de riñón embrionario humano normales, células HEK293T, después de transfección con plásmidos pEGFR-GR, expresan GFP que se puede excitar por láser de 488 nm y tiene un pico de emisión a 509 nm en su citoplasma. Después de tratamiento con dexametasona 1 µM durante 1 hora, la fluorescencia se transloca al núcleo celular desde la región del citoplasma.

Las figuras 8A y 8B muestran imágenes de microscopio de fluorescencia de ejemplo de células transfectadas, pero no tratadas con fármaco (Fig. 8A) y células transfectadas y tratadas con fármaco (Fig. 8B). Las imágenes de las figuras 8A y 8B representan un área de 20 µm por 20 µm. Como se muestra por las imágenes microscópicas representativas de ejemplo de las células HEK293T transfectadas sin tratamiento con fármaco (Fig. 8A) y las de células tratadas (Fig. 8B), la imagen de células tratadas con fármaco tiene menor área de fluorescencia, incluso aunque la magnitud de la intensidad de fluorescencia de células tanto tratadas como sin tratar tiene un intervalo bastante amplio.

Como se muestra en las imágenes de la figura 8A y la figura 8B, la columna izquierda de ambas filas muestra la imagen de fluorescencia; la columna media muestra la imagen de campo claro; y la columna derecha muestra las imágenes superpuestas. La fila 1 muestra la célula de la muestra con fluorescencia distribuida en el citoplasma (por ejemplo, sin tratar con dexametasona). La fila 2 muestra la célula de la muestra con fluorescencia distribuida en el núcleo (tratada con dexametasona). Las células son células de riñón embrionario humano HEK293T transfectadas con plásmidos pEGFR-GR.

Las figuras 9A y 9B muestran imágenes de células de fluorescencia tomadas por el sistema separador de células basado en imágenes de células transfectadas, pero no tratadas con fármaco (Fig. 9A) y células transfectadas y tratadas con fármaco (Fig. 9B). Las imágenes de ejemplo representan un área de 20 µm por 20 µm.

La figura 10 muestra un histograma del área de fluorescencia calculada de ejemplo de todos los sucesos y de las células separadas del estudio de ejemplo.

En el estudio de ejemplo, el criterio de separación se prestableció que fuera 84 µm<sup>2</sup>, de modo que las células tratadas con fármaco se separan por el sistema de ejemplo. En este estudio de ejemplo, debido a las variaciones en el tamaño celular, tamaño del núcleo, y absorción de fármaco por las células, es posible que no todas las células tratadas con fármacos se separen, pero las células separadas tienen toda fluorescencia solo en el núcleo, así la pureza se asegura.

Como se demuestra en la implementación de ejemplo de una forma de realización de ejemplo del sistema 200, los sistemas y técnicas divulgados proporcionan un citómetro de flujo de alto rendimiento con capacidades de separación celular basadas en imágenes fluorescentes y de dispersión de luz de células individuales. Realizando la captura de la imagen celular, la actuación de procesar y separación en FPGA y/o GPU, los resultados de ejemplo muestran que el diseño anteriormente descrito proporciona una latencia de procesamiento global a nivel de milisegundos.

La figura 11 muestra un diagrama de un sistema microfluídico de separación celular basado en imagen 1100 según algunas formas de realización del sistema de separación de partículas basado en imagen 100. El sistema 1100 incluye

un dispositivo microfluídico 1110 para que fluyan partículas a través de un canal de interrogación óptico para separación, un sistema de imagenología 1120 para obtener datos de imagen de las partículas en un área de iluminación del canal de interrogación, un sistema de procesamiento y control de datos 1130 para procesar los datos de imagen obtenidos en tiempo real y determinar un comando de separación, y un actuador 1140 para seleccionar las partículas en el dispositivo microfluídico 210 basado en el comando de separación determinado. En algunas implementaciones del sistema de ejemplo 1110, el dispositivo microfluídico 1110 y el accionador 1140 pueden incluir el dispositivo microfluídico 210 y el accionador 240, respectivamente.

El sistema de imagenología 1120 del sistema 1100 incluye una fuente de luz 1121, por ejemplo, un láser, para proporcionar una luz de entrada o sonda en el área de iluminación del dispositivo microfluídico 1110, y un generador de imágenes óptico 1122 para obtener imágenes de las partículas iluminadas en el área de iluminación 215. El generador de imágenes óptico de ejemplo 1122, como se muestra en la figura 11, incluye una lente objetivo 1123 (por ejemplo, de un microscopio u otro dispositivo de imagenología óptico) ópticamente acoplado a un filtro espacial (SF) 1124, filtros de emisión (EF) 1125A y 1125B, y tubos fotomultiplicadores (PMT) 1126. En la implementación de ejemplo mostrada en la figura 11, el sistema de imagenología incluye espejos dicróicos (DM) 1129A y 1129B, en que DM 1129A está organizado con la fuente de luz para dirigir la luz de entrada al área de iluminación en el dispositivo microfluídico 1110 y DM 1129B está organizado con el generador de imágenes óptico 1122 en la ruta óptica para dirigir una porción de la señal de salida óptica al PMT 1126B a través del EF 1125B, mientras la porción no dirigida de la señal de salida óptica procede al PMT 1126A a través de EF 1125A. En algunas implementaciones, la fuente de luz 1121 (por ejemplo, el láser) está configurada para producir una señal de excitación fluorescente que es incidente sobre el área de iluminación para producir una emisión fluorescente por las partículas. El generador de imágenes óptico 1122 captura la señal de emisión fluorescente de salida óptica en los PMT 1126A y 1126B, de modo que se puede generar una imagen de la partícula.

En implementaciones de ejemplo del sistema 1100, células individuales suspendidas se enfocan hidrodinámicamente en el canal de separación del dispositivo microfluídico 1110 por el flujo de envuelta, asegurando que las células viajan en el centro del canal fluídico a una velocidad uniforme. Por ejemplo, se pueden detectar señales tanto de emisión de fluorescencia como de campo claro por los tubos fotomultiplicadores, por ejemplo, PMT 1126A y 1126B. Para acomodar la geometría del dispositivo microfluídico, un se introduce haz láser a 488 nm del láser 1121 a la interrogación óptica por reflexión de 52 grados por un espejo dicróico miniatura 1129A colocado delante de la lente objetivo 50× (por ejemplo, NA = 0,55, distancia de trabajo = 13 mm). En algunas formas de realización de ejemplo, el sistema 1100 incluye una fuente de luz óptica 1128 (por ejemplo, LED, tal como el LED de 405 nm de ejemplo mostrado en la figura 11), que se puede colocar en el lado opuesto del canal para generar imágenes de campo claro, y en la que la luz se puede enfocar en la posición de iluminación láser. El filtro espacialmente codificado, por ejemplo, SF 1124, se inserta en el plano de la imagen en la ruta de detección. Para dirigir la banda de emisión deseada a sus respectivos PMT, el espejo dicróico 1129B divide la luz fluorescente y de campo claro recogida por la lente objetivo basado en el espectro. La resolución espacial de la imagen reconstruida es determinada por el filtro. La resolución en la dirección x (transversal) depende del número de las hendiduras en el filtro, y en la dirección y (viaje celular) depende de la velocidad de muestreo y velocidad de flujo celular. En la forma de realización de ejemplo del sistema 1100 mostrado en la figura 11, el tamaño de pixel efectivo es 2  $\mu\text{m}$  en la dirección x y aproximadamente 0,4  $\mu\text{m}$  en la dirección y.

La figura 12 muestra un diagrama de flujo de una implementación de procesamiento de imagen de ejemplo de una forma de realización de ejemplo del sistema 1100. La unidad de procesamiento y control de datos 1130 incluye módulos de procesamiento de imágenes para procesar imágenes de fluorescencia y campo claro capturadas por el sistema de imagenología 1120. Un módulo de procesamiento de imágenes de ejemplo, por ejemplo, para implementar aspectos de los procesos 420 y 430 del método 400, por ejemplo, incluye preprocesar los datos de señal de imagen recibidos de los múltiples PMT 1126A y 1126B. En tales implementaciones, las técnicas de preprocesamiento se pueden realizar después de determinar la detección de una célula basado en el análisis de los datos de señal de imagen recibidos. En el ejemplo mostrado en la figura 12, las señales PMT de imágenes de fluorescencia y campo claro se filtran a bajo paso para eliminar el ruido de alta frecuencia. En algunas implementaciones, por ejemplo, se usa una ventana hamming de 10<sup>o</sup> orden para filtrar a bajo paso. El módulo de procesamiento de imágenes de ejemplo se configura para ejecutar un algoritmo de reconstrucción de imagen para reconstruir imágenes tanto de campo claro como de fluorescencia de la señal PMT tiempo-dominio, por ejemplo, en imágenes bidimensionales. Puesto que las señales de campo claro y fluorescencia se generan por las mismas hendiduras, están sincronizadas por la unidad de procesamiento y control de datos 1130. En algunas implementaciones, el algoritmo de reconstrucción de imágenes se lanza una vez tanto para imágenes de campo claro como de fluorescencia. En algunas implementaciones, por ejemplo, las imágenes reconstruidas se redimensionan a 50 × 50 pixeles. En algunas implementaciones, por ejemplo, las imágenes en escala de grises se convierten a imagen binaria basado en un umbral de intensidad. En algunas implementaciones, por ejemplo, las imágenes binarias de filtran por un filtro abierto para eliminar ruido espurio. En algunas implementaciones, por ejemplo, el algoritmo de contorno celular se lanza para detectar el contorno de ambas imágenes binarias. En algunas implementaciones, por ejemplo, se extraen parámetros de morfología basado en imágenes procesadas y se toma la decisión de separación basado en los parámetros extraídos.

La figura 13A muestra un diagrama de flujo que representa datos de ejemplo a través de las etapas de procesamiento de imagen de ejemplo mostradas en la figura 12. En el diagrama, el módulo de procesamiento de imagen de ejemplo produce una imagen reconstruida y redimensionada de la célula individual detectada que incluye características de

contorno de imagen, lo que permite extraer parámetros de características celulares tal como morfología celular de la imagen producida.

5 El algoritmo se implementa en FPGA (National Instruments cRIO-9039). La tabla 2 muestra resultados de latencia aproximada redondeados de ejemplo para cada etapa implementada por el módulo de procesamiento de imágenes de ejemplo de la unidad de procesamiento y control de datos 1130. El procesamiento de imágenes para imágenes de campo claro y fluorescencia se ejecuta en paralelo. Como se muestra en la tabla, la latencia total de procesamiento de imagen es aproximadamente 5,8 ms para este ejemplo.

10 La tabla 2 muestra datos de ejemplo que representan el rendimiento de los módulos en el diseño FPGA de ejemplo para implementaciones de ejemplo del sistema 1100, por ejemplo, en el que la latencia se representa en tiempo (ms).

Tabla 2

	Latencia (ms)
Filtro de bajo paso	0,8
Reconstrucción	0,4
Redimensionar	1,6
Filtro abierto	2
Detección de contorno celular	1
Total	5,8

15 Al disminuir la latencia de tiempo del procesamiento de imágenes, por ejemplo, se puede mejorar el rendimiento de separación. Con FPGA más poderoso que tiene más recursos computacionales, por ejemplo, el módulo de procesamiento de imágenes se puede acompañar adicionalmente para mejorar la latencia de tiempo. El algoritmo de procesamiento de imágenes de ejemplo también se puede implementar en una GPU alternativamente o además (por ejemplo, en procesamiento en paralelo con FPGA), por ejemplo, tal como o bien por la arquitectura CUDA de Nvidia o  
 20 la OpenCL de AMD como ejemplos. Puesto que el algoritmo de procesamiento de imágenes de ejemplo es de datos en paralelo, al utilizar el poder de procesamiento paralelo de GPU, la velocidad de procesamiento se puede acelerar mucho, de modo que se puede alcanzar un rendimiento mucho mayor.

25 En algunas implementaciones, por ejemplo, la unidad de procesamiento y control de datos 1130 se puede configurar para evaluar parámetros de morfología extraídos, por ejemplo, usando características operativas del receptor (ROC). Los parámetros mejores se seleccionan para separación en tiempo real.

30 En algunas implementaciones, un método para evaluar parámetros de morfología extraídos usando la técnica ROC incluye lo siguiente. Por ejemplo, la técnica ROC se puede aplicar a datos procesados de los datos de imagen obtenidos por muestras de células que fluyen a través del sistema. Por ejemplo, las imágenes celulares se pueden separar en dos subconjuntos, por ejemplo, en algunos casos por identificación manual. Como un ejemplo, los dos subconjuntos pueden ser células translocadas (por ejemplo, un grupo separado) y células sin translocar (por ejemplo, un grupo sin separar). Para cada célula, se extraen parámetros de morfología. La técnica ROC puede incluir generar una distribución para cada parámetro de ambos subconjuntos. La técnica incluye generar la curva, que es la curva  
 35 ROC para la distribución. La técnica incluye calcular el área bajo la curva (AUC), es decir, la integración de la curva. La técnica incluye evaluar cómo los parámetros aplican para la clasificación, por ejemplo, el parámetro con la mayor AUC se puede seleccionar como el mejor parámetro adecuado para clasificación.

40 La figura 13B muestra un gráfico de distribución de ejemplo para subconjuntos usando una técnica ROC de ejemplo para evaluar parámetros extraídos tal como parámetros de morfología celular. En el ejemplo mostrado, ROC incluye TP, FP, FN, TN (TP es verdadero positivo, FP es falso positivo, FN es falso negativo, TN es verdadero negativo). La curva de ejemplo representa la curva ROC. El parámetro con mayor AUC es mejor para la clasificación.

45 Después de seleccionar los parámetros para la separación, se puede usar máquina de vectores soporte (SVM) para generar un hiperplano no lineal como criterio de selección usando los parámetros seleccionados.

50 Como un ejemplo, después de separar las imágenes en dos subconjuntos, por ejemplo, tal como los dos subconjuntos de ejemplo, los parámetros seleccionados se calculan para cada imagen. Cada imagen corresponde a un vector n dimensional (n es el número de los parámetros seleccionados). La técnica SVM de ejemplo se implementa para generar el límite en el espacio n dimensional que separa los subconjuntos. Por ejemplo, al tomar decisiones de separación, los parámetros seleccionados para cada célula se pueden calcular, por ejemplo, de modo que se sepa en qué lado del límite está la célula (por ejemplo, a que subconjunto pertenece la célula). Después, se puede tomar la decisión de separación.

55 Se muestran parámetros de morfología extraídos de ejemplo en la tabla 3.

Tabla 3

Imagen de fluorescencia	Imagen de campo claro	Imagen de fluorescencia + imagen de campo claro
Área	Área	Área de fluorescencia/área de campo claro (proporción de área)
Perímetro	Perímetro	Perímetro de fluorescencia/perímetro de campo claro (proporción de perímetro)
Factor de forma (área/perímetro)	Factor de forma (área/perímetro)	
Diámetro (en la dirección x)	Diámetro (en la dirección x)	
Diámetro (en la dirección y)	Diámetro (en la dirección y)	

5 Se describen implementaciones de ejemplo del método 400 usando el sistema 1100 a continuación para estudios de ejemplo que demuestran la separación celular basada en imágenes, incluyendo la separación basada en translocación de proteínas, separación basada en ciclo de vida celular, y separación basada en el número de perlas unidas a la membrana celular de las células.

10 Un estudio de ejemplo incluía la separación de células de riñón embrionario humano HEK-297T translocadas con plásmidos pEGFP-GR, por ejemplo, una implementación de separación basada en translocación de proteínas. El estudio de ejemplo demostró la capacidad de identificar y separar células de riñón embrionario humano HEK-297T translocadas con plásmidos pEGFP-GR de mezclas translocadas y sin translocar. En el estudio, células de riñón embrionario humano HEK-293T se transfectaron con GR-GFP y se separaron en 2 placas. Una placa de células no se trató de modo que la fluorescencia permanece en el citoplasma. La otra placa se trató con fármacos de modo que la fluorescencia migra del citoplasma al núcleo. Ambos tipos de células se mezclaron y se pasaron a través del sistema, en el que solo las células translocadas se separaron y recogieron basado en la implementación del método de ejemplo.

15 En el estudio de ejemplo, la señal PMT registrada se procesó por la unidad de procesamiento y control de datos, por ejemplo, ejecutando los algoritmos implementados por el código Matlab. Basado en la señal PMT, se reconstruyeron imágenes tanto de fluorescencia como de campo claro de cada célula, y los parámetros de morfología de cada célula se extrajeron y registraron. Los parámetros de morfología extraídos se usaron para aprendizaje de máquina supervisado para generar criterios para separación celular basada en imagen en tiempo real.

20 En el estudio de ejemplo, las imágenes reconstruidas se separaron en dos subconjuntos por identificación manual. Un subconjunto de células era células sin translocar con fluorescencia en el citoplasma, el otro subconjunto de células era células translocadas con fluorescencia en el núcleo.

25 Las figuras 14A y 14B muestran imágenes celulares de células sin translocar y células translocadas capturadas por el sistema de ejemplo y reconstruidas por el código Matlab. La figura 14A muestra imágenes de células sin translocar, y la figura 14B muestra imágenes de células translocadas. En las imágenes de las figuras 14A y 14B, la imagen en la izquierda es la imagen de fluorescencia de la célula, la imagen en el medio es la imagen de campo claro de la célula, y la imagen en la derecha es la imagen superpuesta con contorno de campo claro detectado.

30 En el estudio de ejemplo, se evaluaron parámetros de morfología basado en los dos subconjuntos anotados usando características operativas del receptor (ROC). Los 3 mejores parámetros se seleccionaron para separación en tiempo real. Por ejemplo, los 3 mejores parámetros en este caso fueron área de fluorescencia/área de campo claro (por ejemplo, proporción de área), perímetro de fluorescencia/perímetro de campo claro (por ejemplo, proporción de perímetro), y área de fluorescencia.

35 En el estudio de ejemplo, los criterios de separación usando los tres parámetros seleccionados se emplearon para separación en tiempo real de las células en el sistema. Se formó un hiperplano no lineal que separa los dos subconjuntos de células basado en los tres mejores parámetros seleccionados por máquina de vectores soporte (SVM).

40 La figura 15 muestra un ejemplo de un hiperplano que muestra separación de los dos conjuntos de células (por ejemplo, células translocadas y células sin translocar) para implementaciones de los criterios de separación.

45 Los dos tipos de células se mezclaron 50:50 y se diluyeron a 200/μl usando solución salina tamponada en fosfato (PBS). La muestra mezclada se hizo fluir a través del sistema de separación basado en imágenes de ejemplo y se separaron basado en el módulo de tiempo real. Las células viajaron a una velocidad de 8 cm/s que está dada por la velocidad de flujo de la muestra de 6 μl/min y la velocidad de flujo de envuelta de 60 μl/min. El generador de imágenes de ejemplo incluía un microscopio con una cámara CCD que se usó para capturar imágenes tanto de fluorescencia como de campo claro de las células recogidas.

55 Las figuras 16A y 16B muestran imágenes celulares de células sin translocar y células translocadas capturadas por el sistema de ejemplo, mediante el microscopio. La figura 16A muestra imágenes de microscopio de células sin translocar, y la figura 16B muestra imágenes de microscopio de células translocadas. En las imágenes de las figuras

16A y 16B, la imagen en la izquierda es la imagen de fluorescencia de la célula captada por el microscopio, la imagen en el medio es la imagen de campo claro de la célula por el microscopio, y la imagen a la derecha es la imagen superpuesta.

5 Un estudio de ejemplo incluía la separación de células epiteliales de riñón canino Madin-Darby MDCK en la fase G2/M, por ejemplo, una implementación de separación basada en el ciclo de vida celular. En el estudio, las células epiteliales de riñón canino Madin-Darby MDCK se fijaron y el núcleo celular se tiñó con yoduro de propidio (PI). Las células MDCK fijadas y teñidas se hicieron fluir a través del sistema de separación basado en imagen, y solo células en la fase G2/M se separaron y recogieron.

10 De forma similar al estudio de ejemplo para separación basada en translocación de proteínas, las señales PMT registradas se procesaron para reconstruir imágenes celulares y extraer parámetros de morfología. Las imágenes celulares reconstruidas se separaron en dos subconjuntos por identificación manual. Un subconjunto de células estaba en fase G1. En la fase G1, los constituyentes del núcleo están confinados en la membrana nuclear. El otro subconjunto de células estaba en la fase G2/M. En la fase G2/M, la membrana nuclear se rompe y los constituyentes del núcleo se distribuyen en la célula.

15 Las figuras 17A y 17B muestran imágenes de células en fase G1 y células en fase G2/M capturadas por el sistema de ejemplo y reconstruidas por el código Matlab. La figura 17A muestra imágenes de células en fase G1, y la figura 17B muestra imágenes de células en fase G2/M. En las imágenes de las figuras 17A y 17B, la imagen en la izquierda es la imagen de fluorescencia de la célula, la imagen en el medio es la imagen de campo claro de la célula, y la imagen en la derecha es la imagen superpuesta con contorno de campo claro detectado.

20 De forma similar al estudio de ejemplo para separación basada en translocación de proteínas, se evaluaron parámetros de morfología usando ROC, y se formó un hiperplano no lineal tridimensional por SVM. Los 3 mejores parámetros son área de fluorescencia/área de campo claro (por ejemplo, proporción de área), área de fluorescencia y perímetro de fluorescencia/perímetro de campo claro (por ejemplo, proporción de perímetro).

25 La figura 18 muestra un ejemplo de un hiperplano que muestra separación de dos conjuntos de células (por ejemplo, células en fase G1 y células en fase G2/M) para implementaciones de criterios de separación.

30 Las células MDCK se diluyeron a 200/μl usando PBS. La muestra se hizo fluir a través del sistema de ejemplo y se separaron basado en el módulo de tiempo real. Las células viajaron a una velocidad de 8 cm/s que está dada por la velocidad de flujo de la muestra de 6 μl/min y la velocidad de flujo de envuelta de 60 μl/min. El generador de imágenes de ejemplo incluía un microscopio con una cámara CCD que se usó para capturar imágenes tanto de fluorescencia como de campo claro de las células recogidas.

35 Las figuras 19A y 19B muestran imágenes celulares de células en fase G1 y células en fase G2/M capturadas por el sistema de ejemplo, a través del microscopio. La figura 19A muestra imágenes de microscopio de células en fase G1, y la figura 19B muestra imágenes de microscopio de células en fase G2/M. En las imágenes de las figuras 19A y 19B, la imagen en la izquierda es la imagen de fluorescencia de la célula captada por el microscopio, la imagen en el medio es la imagen de campo claro de la célula por el microscopio, y la imagen a la derecha es la imagen superpuesta.

40 Un estudio de ejemplo incluía la separación de células de riñón embrionario humano HEK-297T basado en el número de perlas unidas con las células, por ejemplo, una implementación de separación basada en el número de perlas unidas en la membrana celular de las células. En el estudio, células de riñón embrionario humano HEK-297T se unieron con perlas fluorescentes y tiñeron con kits de CFSE. La fluorescencia de las células era a 520 nm y la fluorescencia de las perlas es a 645 nm. Las señales de fluorescencia en dos longitudes de onda son dirigidas por un espejo dicróico y detectadas por dos PMT. Las células se separaron basado en el número de perlas unidas. El módulo de procesamiento de imagen para esta aplicación se modificó en consecuencia para procesar las imágenes.

45 La figura 20 muestra un diagrama de flujo de una implementación de procesamiento de imágenes de ejemplo para la separación basada en el número de perlas unidas en la membrana celular de las células implementado por una forma de realización de ejemplo del sistema 1100. La unidad de procesamiento y control de datos 1130 incluye módulos de procesamiento de imágenes para procesar imágenes de fluorescencia y campo claro capturadas por el sistema de imagenología 1120. Un módulo de procesamiento de imágenes de ejemplo, por ejemplo, para implementar aspectos de los procesos 420 y 430 del método 400, por ejemplo, incluye preprocesar los datos de señal de imagen recibidos de los múltiples PMT 1126A y 1126B. Como se muestra en el diagrama, por ejemplo, las señales de fluorescencia en ambas longitudes de onda se filtraron a bajo paso. La señal de fluorescencia a 520 se usó para reconstrucción de imagen en este estudio de ejemplo. La imagen de perlas reconstruida se redimensionó a 50×50 píxeles. Se implementó la transformación de sombrero de copa para eliminar fondo de imagen. En esta implementación de ejemplo, se usó una vecindad de 7×7 píxeles para la transformación de sombrero de copa. En esta implementación de ejemplo, una imagen en escala de grises se convirtió a una imagen binaria. Se extrajeron parámetros de morfología. En este ejemplo, el área de imagen se eligió como criterio de separación ya que las perlas tienen un tamaño relativamente uniforme. En algunas implementaciones, por ejemplo, los parámetros de morfología se extraen basado en imágenes procesadas y la decisión de separación se toma basada en los parámetros extraídos.

La tabla 4 muestra que la latencia total del procesamiento de imagen en tiempo real es 7,8 ms. Los módulos de ejemplo se implementaron usando FPGA para el recuento de perlas.

5 Tabla 4

	Latencia (ms)
Filtro de bajo paso	0,8
Reconstrucción	0,4
Redimensionado	1,6
Transformación de sombrero de copa	5
Total	7,8

10 La figura 21 muestra ejemplos de imágenes celulares en escala de grises procesadas por el módulo de procesamiento de imágenes con diferente número de perlas. Como se muestra en la figura 21, las imágenes en la columna izquierda son imágenes de fluorescencia de perlas, las imágenes en la columna media con imagen de fluorescencia de las células, y las imágenes en la columna derecha son imágenes superpuestas.

La figura 22 muestra un histograma del área de imagen de perlas para diferente número de perlas.

15 Las implementaciones del objeto y las operaciones funcionales descritas en este documento de patente se pueden implementar en varios sistemas, circuitería electrónica digital, o en software informático, firmware, o hardware, incluyendo las estructuras divulgadas en esta especificación y sus equivalentes estructurales, o en combinación con uno o más de ellos. Las implementaciones del objeto descritas en esta especificación se pueden implementar como un o más productos de programa informático, es decir, uno o más módulos de instrucciones de programa informático codificados en un medio legible por ordenador tangible y no transitorio para la ejecución por, o para controlar la  
 20 operación del, aparato de procesamiento de datos. El medio legible por ordenador puede ser un dispositivo de almacenamiento legible por máquina, un sustrato de almacenamiento legible por máquina, un dispositivo de memoria, una composición de materia que efectúa una señal propagada legible por máquina, o una combinación de uno o más de ellos. El término "unidad de procesamiento de datos" o "aparato de procesamiento de datos" abarca todos los aparatos, dispositivos, y máquinas para procesar datos, incluyendo a modo de ejemplo un procesador programable, un ordenador, o múltiples procesadores u ordenadores. El aparato puede incluir, además del hardware, código que crea un entorno de ejecución para el programa informático en cuestión, por ejemplo, código que constituye firmware procesador, una pila de protocolos, un sistema de gestión de base de datos, un sistema operativo, o una combinación de uno o más de ellos.

30 Un programa informático (también conocido como un programa, software, aplicación de software, guion, o código) se puede escribir en cualquier forma de lenguaje de programación, incluyendo lenguajes compilados o interpretados, y puede desplegarse en cualquier forma, incluyendo como un programa independiente o como un módulo, componente, subrutina, u otra unidad adecuada para uso en un entorno informático. Un programa informático no corresponde necesariamente a un fichero en un sistema de ficheros. Un programa se puede almacenar en una porción de un fichero que contiene otros programas o datos (por ejemplo, uno o más guiones almacenados en un documento de lenguaje de marcado), en un fichero único dedicado al programa en cuestión, o en múltiples ficheros coordinados (por ejemplo, ficheros que almacenan uno o más módulos, subprogramas, o porciones de código). Un programa informático se puede desplegar para que se ejecute en un ordenador o en múltiples ordenadores que están localizados en un sitio o distribuidos a través de múltiples sitios e interconectados por una red de comunicación.

40 Los procesos y flujos lógicos descritos en esta especificación se pueden realizar mediante uno o más procesadores programables que ejecutan uno o más programas informáticos para realizar funciones operando en datos de entrada y generar salida. Los procesos y flujos lógicos también se pueden llevar a cabo mediante, y aparato también se puede implementar como, circuitería lógica de fin especial, por ejemplo, una FPGA (matriz de puerta programable en campo) o un ASIC (circuito integrado específico de aplicación).

45 Los procesadores adecuados para la ejecución de un programa informático incluyen, a modo de ejemplo, microprocesadores tanto generales como de fin especial, y uno o más procesadores de cualquier tipo de ordenador digital. En general, un procesador recibirá instrucciones y datos de una memoria de lectura solo o una memoria de acceso aleatorio o ambos. Los elementos esenciales de un ordenador son un procesador para realizar las instrucciones y uno o más dispositivos de memoria para almacenar instrucciones y datos. En general, un ordenador también incluirá, o estará operativamente acoplado para recibir datos de o transferir datos a, o ambos, uno o más dispositivos de almacenamiento de masa para almacenar datos, por ejemplo, discos magnéticos, magnetoópticos o discos ópticos. Sin embargo, un ordenador no necesita tener tales dispositivos. Los medios legibles por ordenador  
 50 adecuados para almacenar instrucciones de programas informáticos y datos incluyen todas las formas de memoria no volátil, medios y dispositivos de memoria, incluyendo a modo de ejemplo, dispositivos de memoria semiconductores, por ejemplo, EPROM, EEPROM, y dispositivos de memoria flash. El procesador y la memoria se pueden suplementar por, o incorporar en, circuitería lógica de fin especial.

Se pretende que la especificación, junto con los dibujos, se considere ejemplar solo, donde ejemplar significa un ejemplo. Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" se pretende que incluyan las formas plurales también, a menos que el contexto claramente indique otra cosa. Además, el uso de "o" se pretende que incluya "y/o", a menos que el contexto claramente indique otra cosa.

5 Mientras este documento de patente contiene muchos detalles, estos no se deben considerar como limitaciones en el ámbito de cualquier invención o de lo que se puede reivindicar, sino más bien descripciones de características que pueden ser específicas a formas de realización particulares de invenciones particulares. Ciertas características que se describen en este documento de patente en el contexto de formas de realización separadas también se pueden  
10 implementar en combinación en una única forma de realización. Por el contrario, varias características que se describen en el contexto de una única forma de realización también se pueden implementar en múltiples formas de realización por separado o en cualquier combinación adecuada. Además, aunque se pueden describir características anteriormente como que actúan en ciertas combinaciones e incluso inicialmente reivindicar como tales, una o más  
15 características de una combinación reivindicada puede, en algunos casos, eliminarse de la combinación, y la combinación reivindicada se puede dirigir a una subcombinación o variación de una subcombinación.

De forma similar, mientras se representan operaciones en los dibujos en un orden particular, esto no se debe entender que se requiere que tales operaciones se realicen en el orden particular mostrado o en orden secuencial, o que todas  
20 las operaciones ilustradas se realicen, para lograr resultados deseables. Además, la separación de varios componentes del sistema en las formas de realización descritas en este documento de patente no se debe entender como que se requiere tal separación en todas las formas de realización.

Varias formas de realización descritas en el presente documento se describen en el contexto general de métodos o procesos, que se pueden implementar en una forma de realización por un producto de programa informático, incorporado en un medio legible por ordenador, incluyendo instrucciones ejecutables por ordenador, tal como un código  
25 de programa, ejecutado por ordenadores en entornos de red. Un medio legible por ordenador puede incluir dispositivos de almacenamiento extraíbles y no extraíbles incluyendo, pero no limitado a, memoria de lectura solo (ROM), memoria de acceso aleatorio (RAM), discos compactos (CD), discos versátiles digitales (DVD), discos Blu-ray, etc. Por tanto, los medios legibles por ordenador descritos en la presente solicitud incluyen medios de almacenamiento no  
30 transitorios. En general, los módulos de programa pueden incluir rutinas, programas, objetos, componentes, estructuras de datos, etc., que realizan tareas particulares o implementan tipos de datos abstractos particulares. Las instrucciones ejecutables por ordenador, estructuras de datos asociadas, y módulos de programa representan ejemplos de código de programa para ejecutar etapas de los métodos divulgados en el presente documento. La  
35 secuencia particular de tales instrucciones ejecutables o estructuras de datos asociadas representan ejemplos de actos correspondientes para implementar las funciones descritas en tales etapas o procesos.

Por ejemplo, un aspecto de las formas de realización divulgadas se refiere a un producto de programa informático que está incorporado en un medio legible por ordenador no transitorio. El producto de programa informático incluye código de programa para llevar a cabo una o y/o todas las operaciones de las formas de realización divulgadas.  
40

Solo se describen unas pocas implementaciones y ejemplos y otras implementaciones, mejoras y variaciones se pueden hacer basado en lo que se describe e ilustra en este documento de patente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para separación celular, que comprende:
  - 5 obtener (405, 410) datos de señal de imagen de una célula que fluye a través de un canal de un dispositivo de flujo de partículas;
  - procesar (420) los datos de señal de imagen para producir un conjunto de datos de imagen representativo de una imagen de la célula, en donde el procesamiento de los datos de señal de imagen incluye detectar la presencia de la célula antes de producir el conjunto de datos de imagen representativo de la imagen de la célula,
  - 10 en donde el detectar la presencia de la célula incluye:
    - calcular un valor de brillo asociado con una magnitud de intensidad de señal de los datos de señal de imagen;
    - comparar el valor de brillo con un primer umbral;
    - determinar un valor derivado en el tiempo del brillo cuando el valor del brillo supera el primer umbral;
    - evaluar que el valor derivado en el tiempo es menor que un segundo umbral; y
    - 15 cuando el valor derivado en el tiempo es menor que el segundo umbral, seguir procesando los datos de señal de imagen;
  - analizar (430) el conjunto de datos de imagen producido para identificar una o más propiedades de la célula de los datos de imagen procesados;
  - 20 evaluar la una o más propiedades identificadas de la célula con un criterio de separación para producir un comando de control (440) para separar la célula basado en uno o más atributos celulares establecidos de los datos de señal de imagen correspondientes a la célula durante el flujo de la célula en el dispositivo de flujo de partículas; y
  - dirigir (445) la célula en una de una pluralidad de rutas de salida del dispositivo de flujo de partículas basado en el comando de control.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el procesamiento de los datos de señal de imagen para producir el conjunto de datos de imagen incluye:
  - filtrar los datos de señal de imagen;
  - 30 reconstruir una primera imagen basada en los datos filtrados.
3. El método de la reivindicación 2, en donde procesar los datos de señal de imagen para producir el conjunto de datos de imagen incluye redimensionar la primera imagen reconstruida para producir una segunda imagen, en donde la segunda imagen incluye datos de imagen binaria.
- 35 4. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde producir el comando de control incluye extraer uno o más parámetros de los datos de imagen procesados de la célula asociados con la una o más propiedades identificadas de la célula y comparar el uno o más parámetros extraídos de la imagen con el uno o más valores umbral de los criterios de separación.
- 40 5. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la una o más propiedades asociadas con la célula incluye una o más de una cantidad o un tamaño de una característica de la célula, una o más partículas unidas a la célula, o una morfología particular de la célula o porción de la célula.
- 45 6. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde los criterios de separación incluyen un contorno celular, un tamaño celular, una forma celular, un tamaño del núcleo, una forma de núcleo, un patrón fluorescente, o una distribución de color fluorescente.
- 50 7. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la una o más propiedades asociadas con la célula incluyen una propiedad fisiológica de la célula incluyendo una fase de ciclo de vida celular, una expresión o localización de una proteína por la célula, una expresión o localización de un gen por la célula, un daño a la célula, o un engullimiento de una sustancia o una partícula por la célula.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el daño determinado a la célula incluye daño al ADN.
- 55 9. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la una o más propiedades asociadas con la célula incluye un área de fluorescencia, una proporción de área, o una proporción de perímetro.
10. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde los criterios de separación incluyen criterios de selección definidos por el usuario que comprenden características espaciales.
- 60 11. Un producto de programa informático que comprende instrucciones que, cuando son ejecutadas por un ordenador, producen que el ordenador lleve a cabo las etapas de método como sigue:
  - 65 obtener (410) datos de señal de imagen de una célula que fluye a través de un canal de un dispositivo de flujo de partículas;

## ES 3 024 557 T3

procesar (420) los datos de señal de imagen para producir un conjunto de datos de imagen representativo de una imagen de la célula, en donde el procesamiento de los datos de señal de imagen incluye detectar la presencia de la célula antes de producir el conjunto de datos de imagen representativo de la imagen de la célula, en donde el detectar la presencia de la célula incluye:

- 5        calcular un valor de brillo asociado con una magnitud de intensidad de señal de los datos de señal de imagen;
- comparar el valor de brillo con un primer umbral;
- determinar un valor derivado en el tiempo del brillo cuando el valor del brillo supera el primer umbral;
- evaluar que el valor derivado en el tiempo es menor que un segundo umbral; y
- 10        cuando el valor derivado en el tiempo es menor que el segundo umbral, seguir procesando los datos de señal de imagen;

analizar (430) el conjunto de datos de imagen producido para identificar una o más propiedades de la célula de los datos de imagen procesados;

- 15        evaluar la una o más propiedades identificadas de la célula con un criterio de separación para producir un comando de control (440) para separar la célula basado en uno o más atributos celulares establecidos de los datos de señal de imagen correspondientes a la célula durante el flujo de la célula en el dispositivo de flujo de partículas.

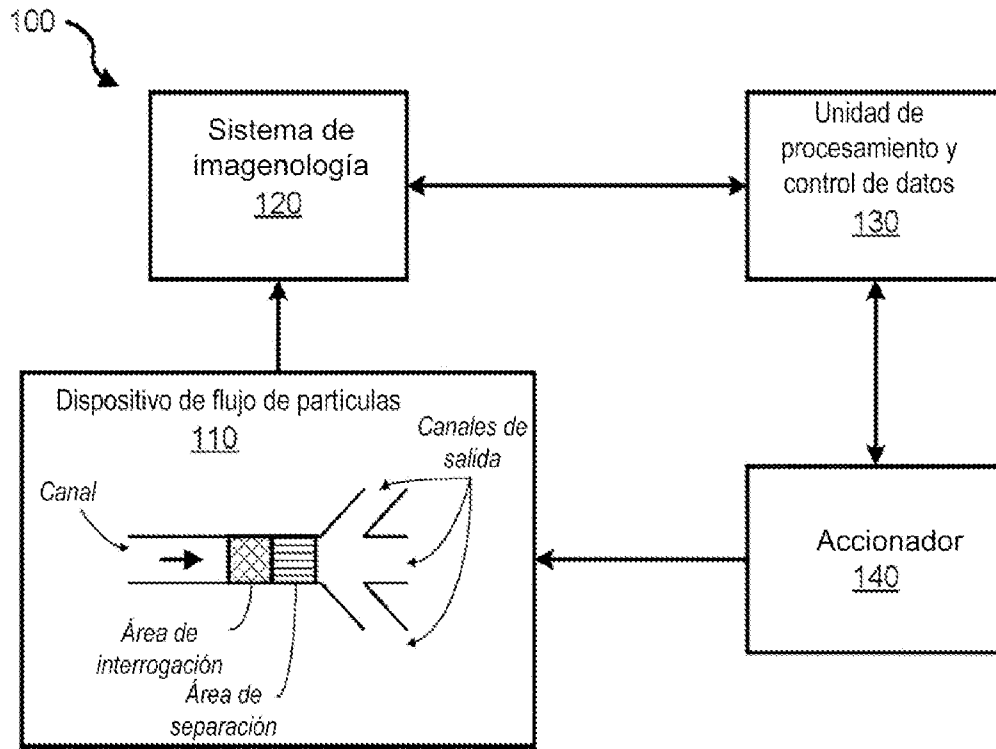


FIG. 1A

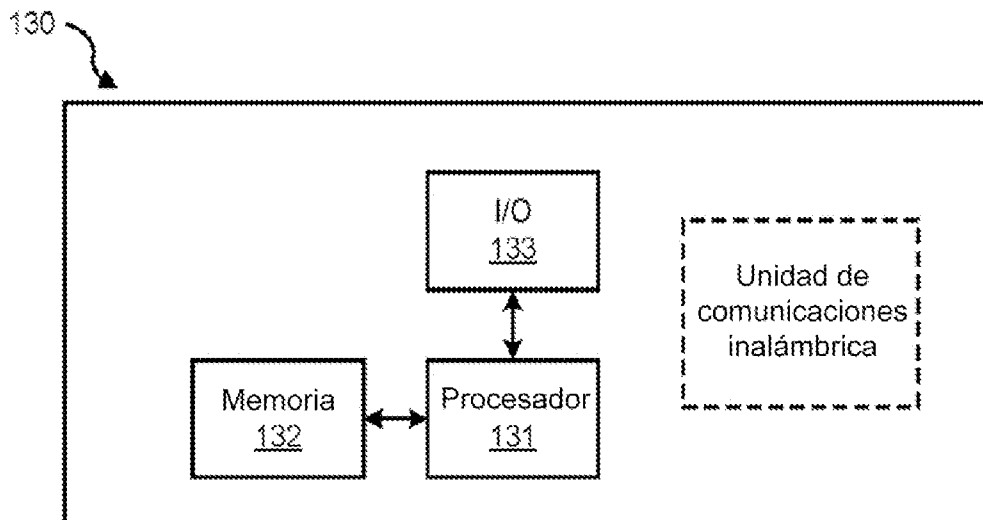


FIG. 1B

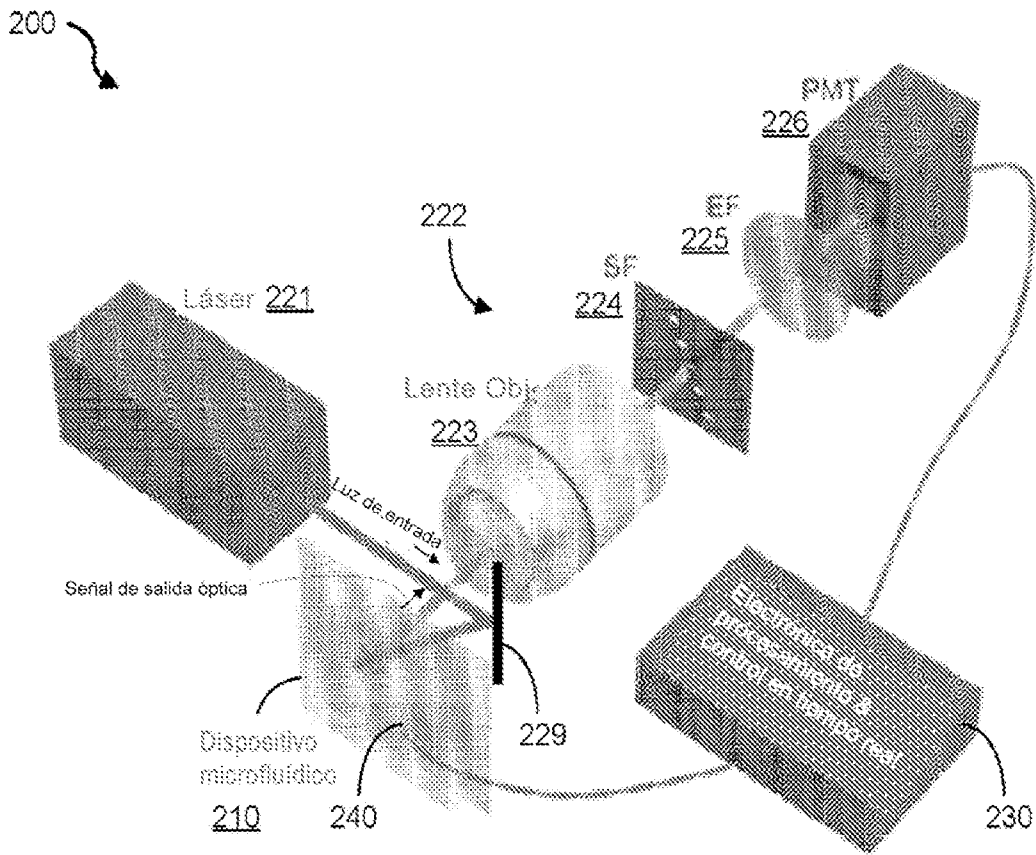


FIG. 2A

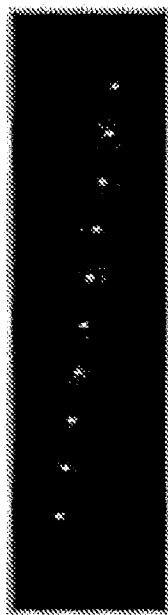


FIG. 2B

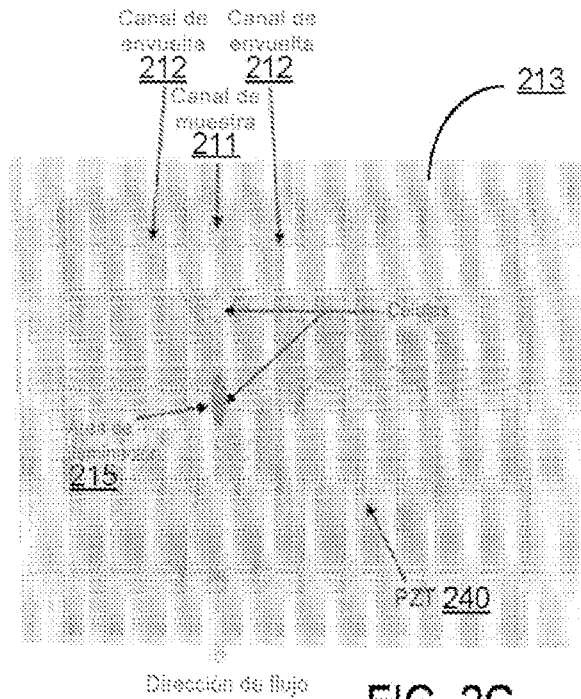


FIG. 2C

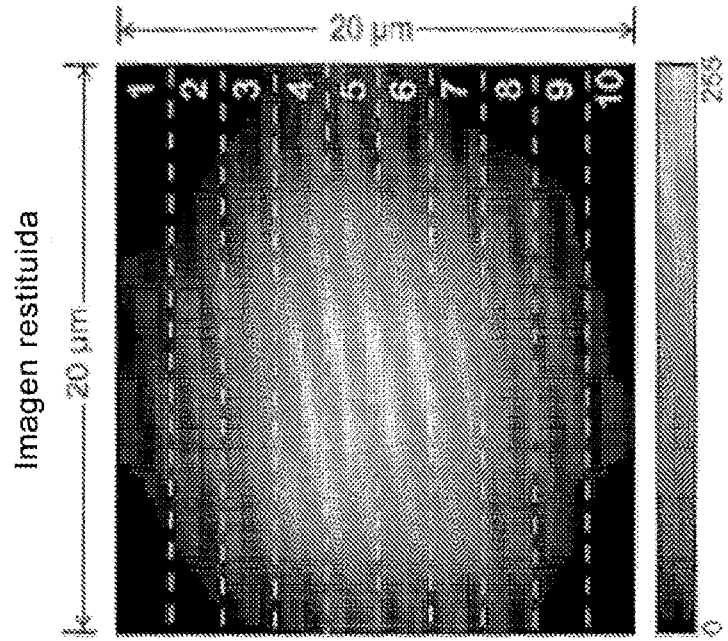


FIG. 3B

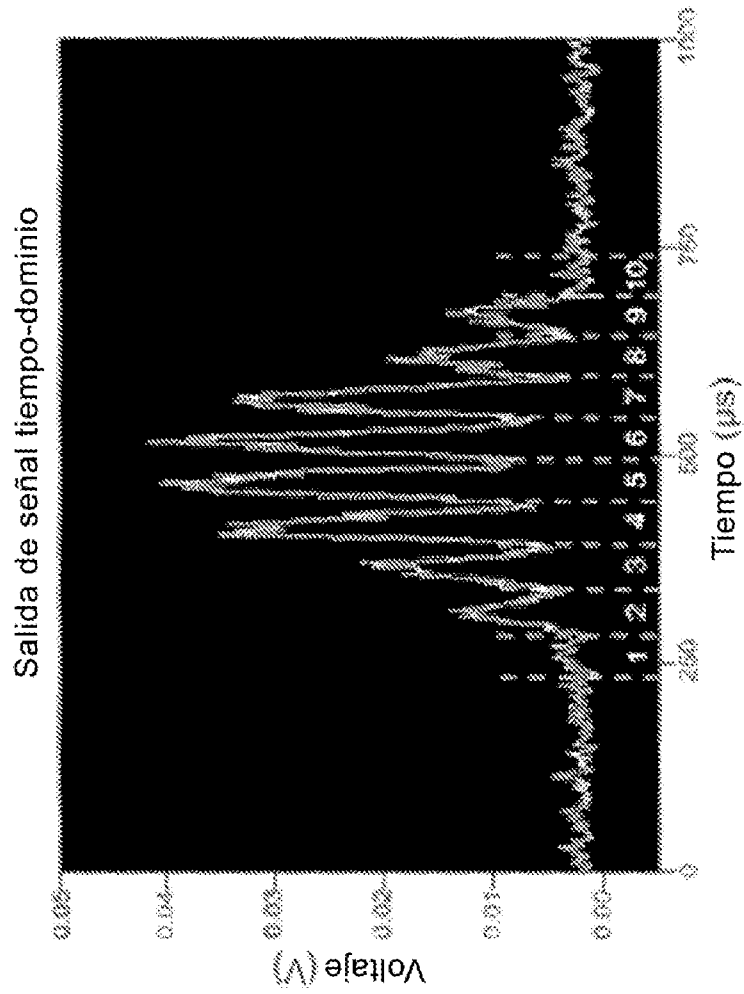


FIG. 3A

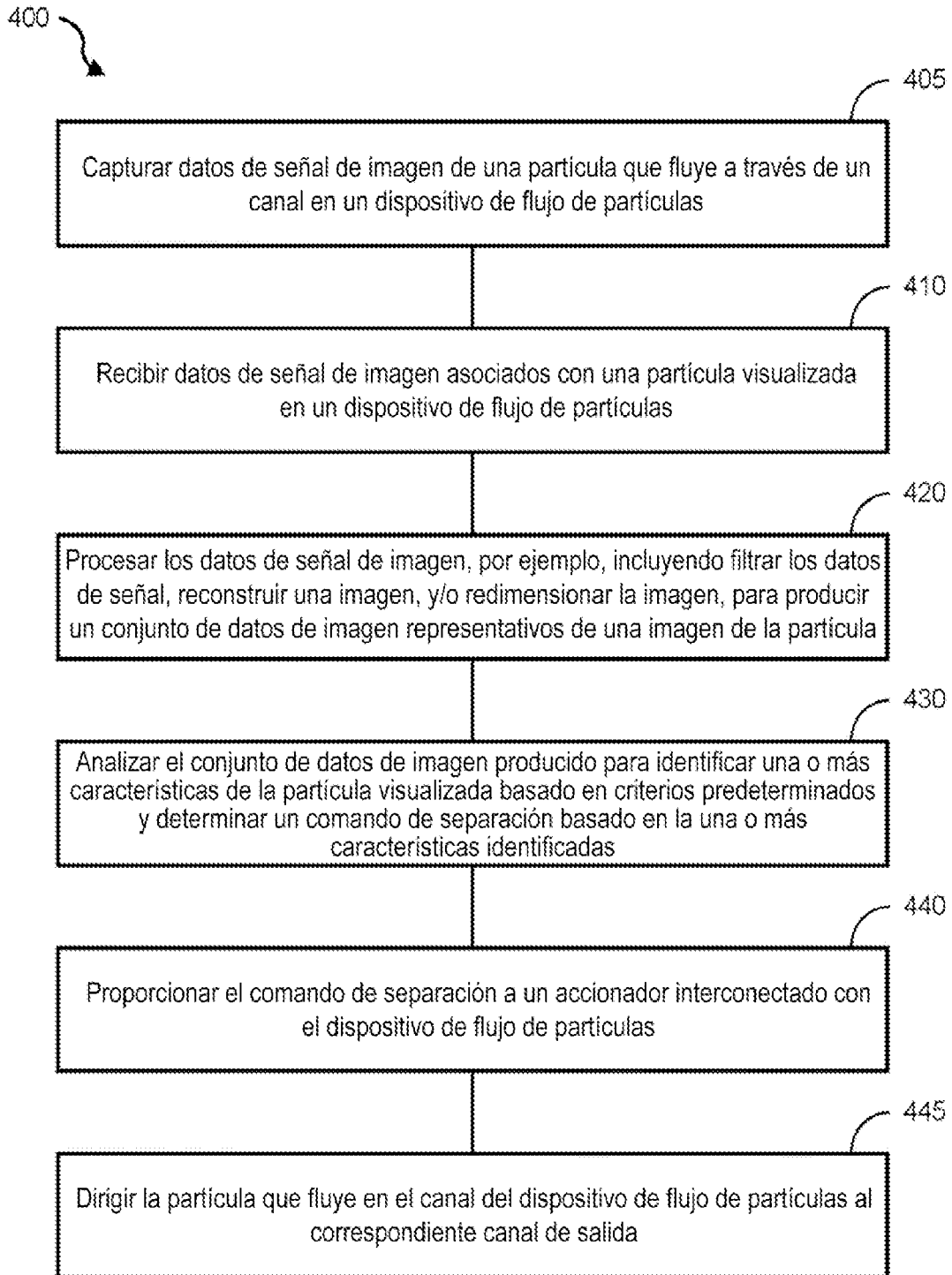


FIG. 4A

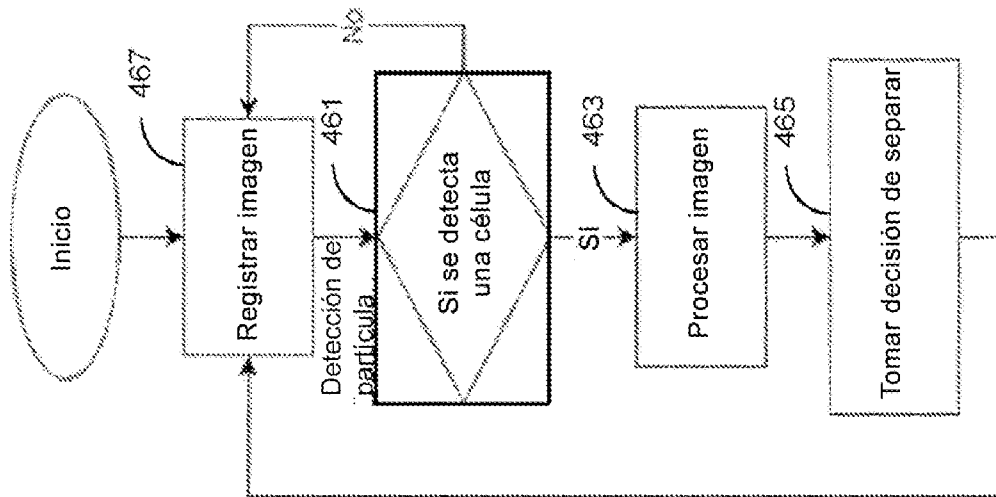


FIG. 4B

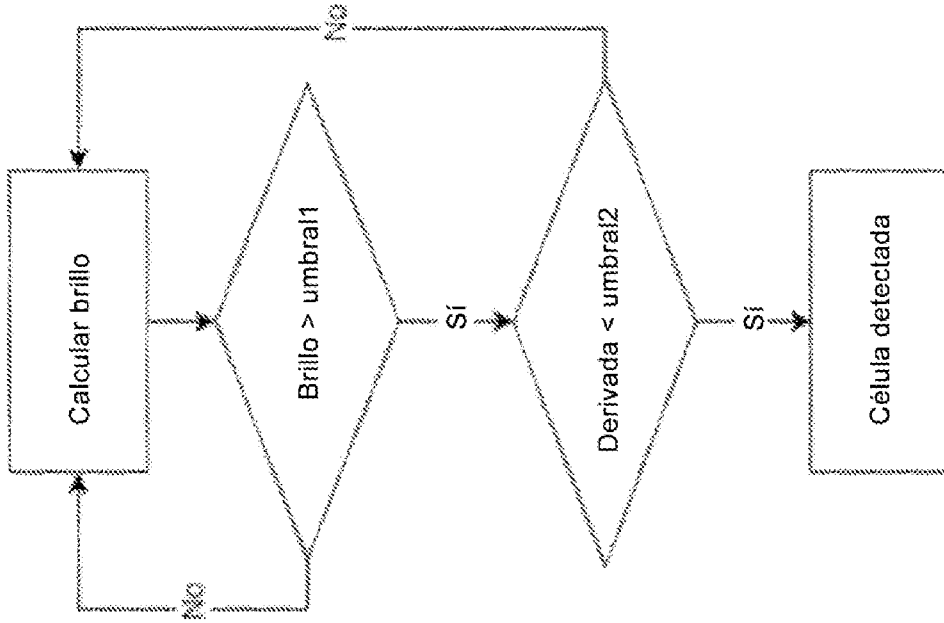


FIG. 4C

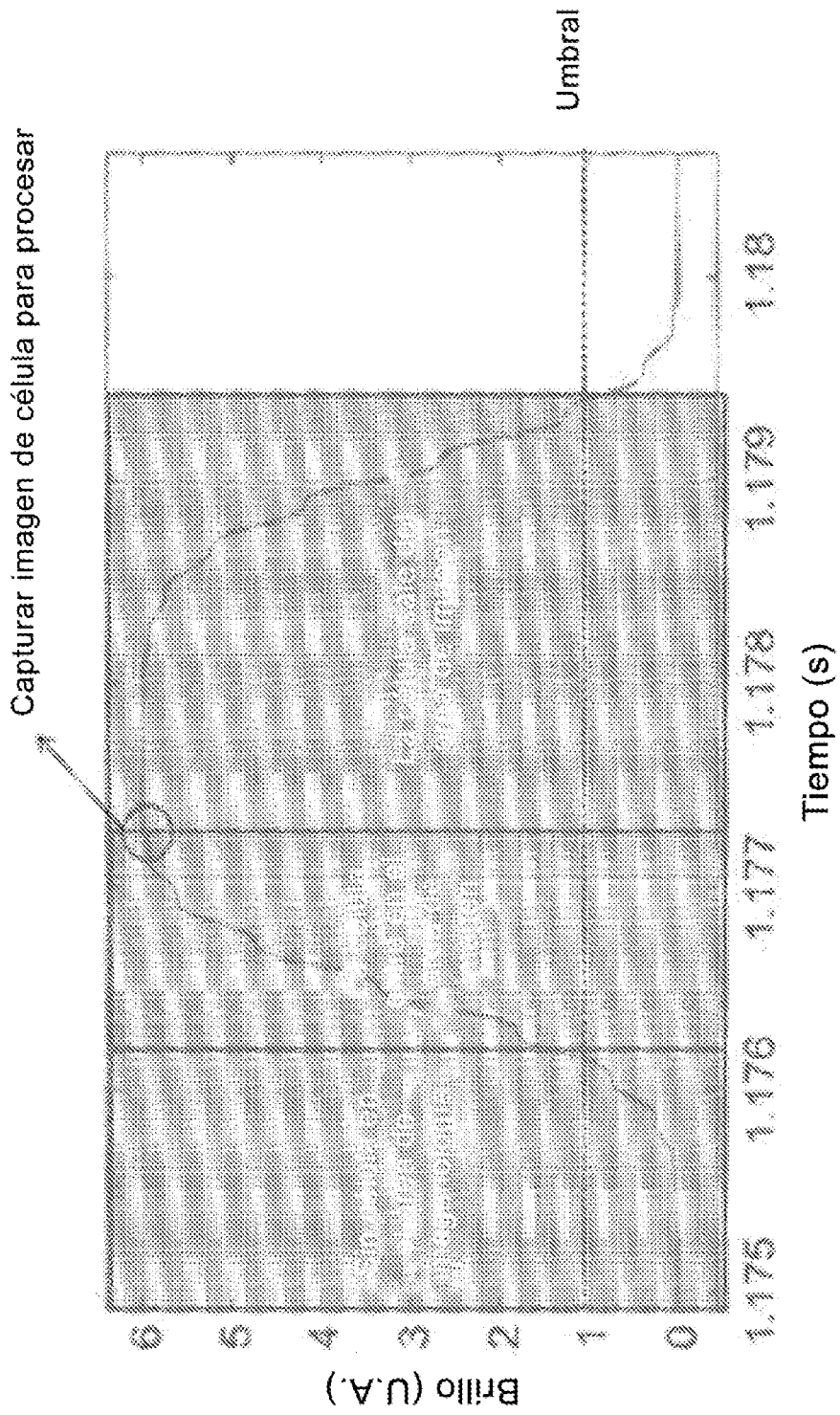


FIG. 4D

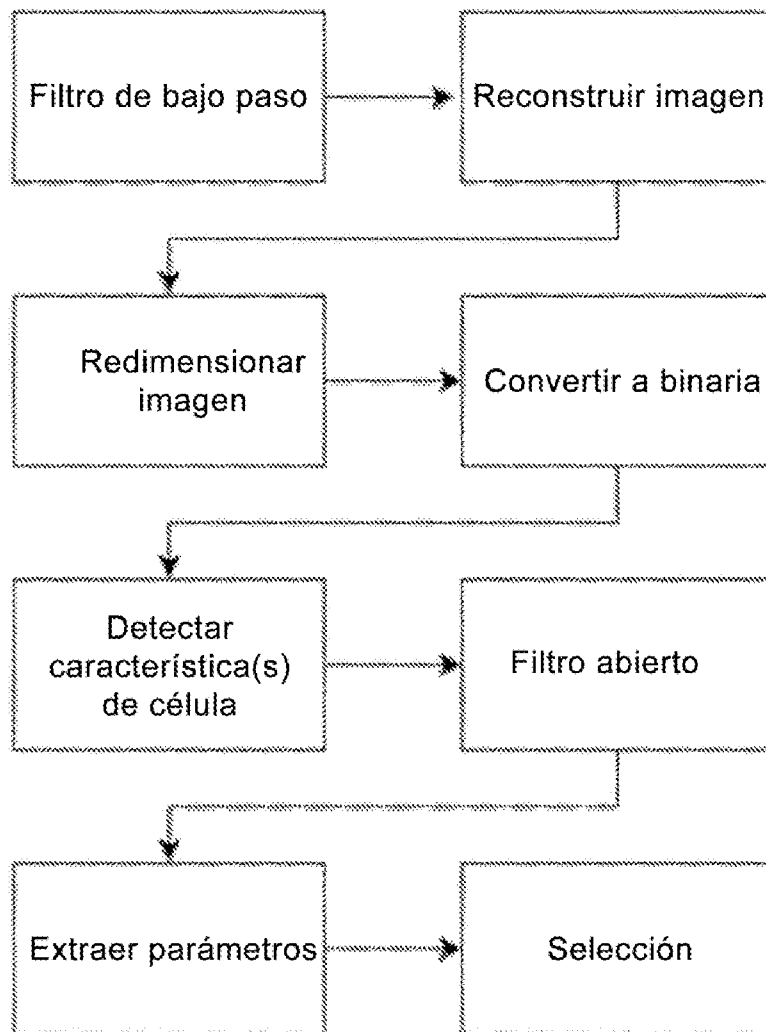


FIG. 5A

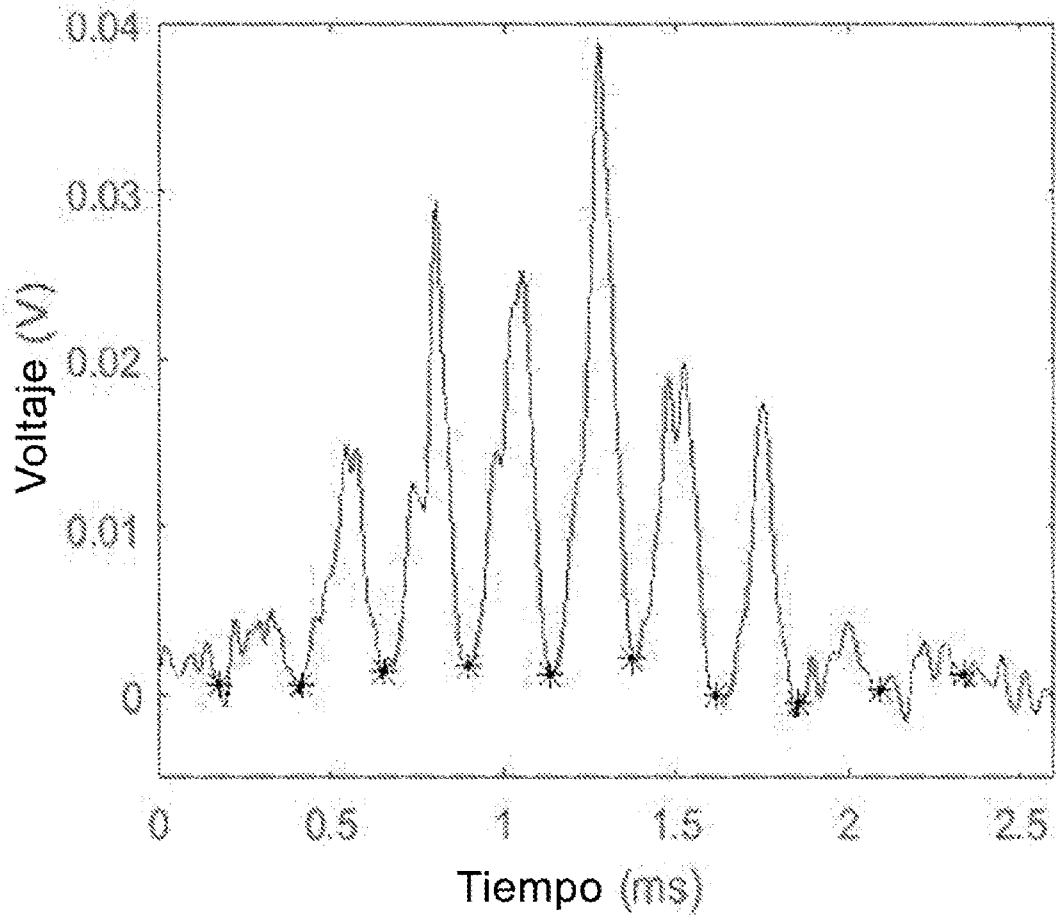


FIG. 5B

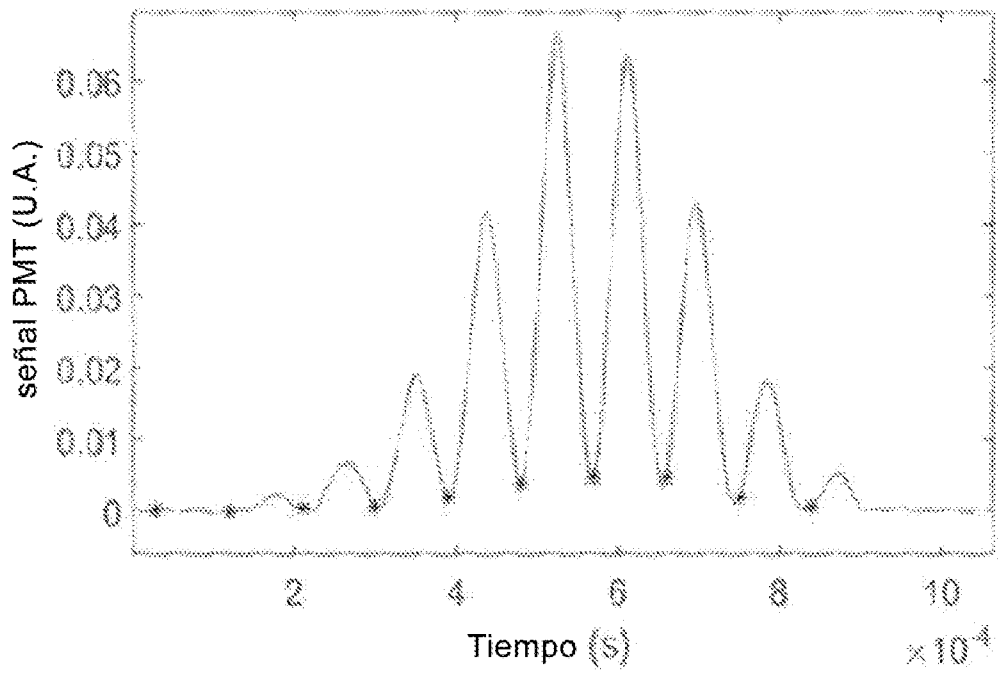


FIG. 6

Todos los pixeles dentro de la vecindad igual a 1:  
No pared celular

Algunos pixeles dentro de la vecindad igual a 0:  
Pared celular

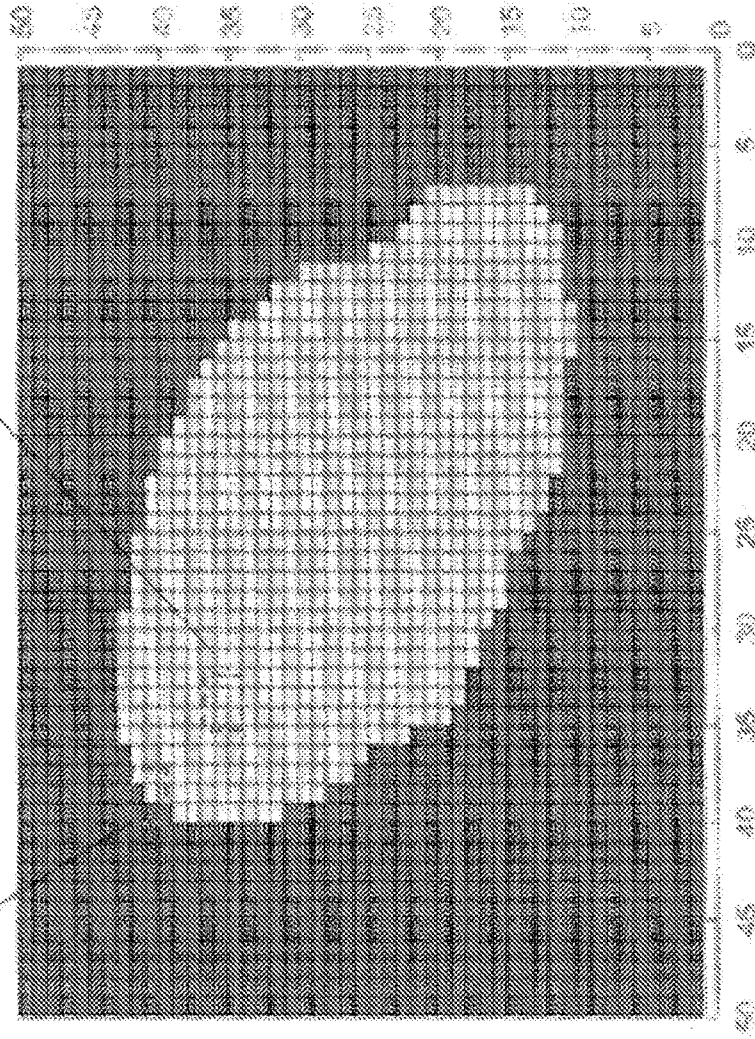


FIG. 7

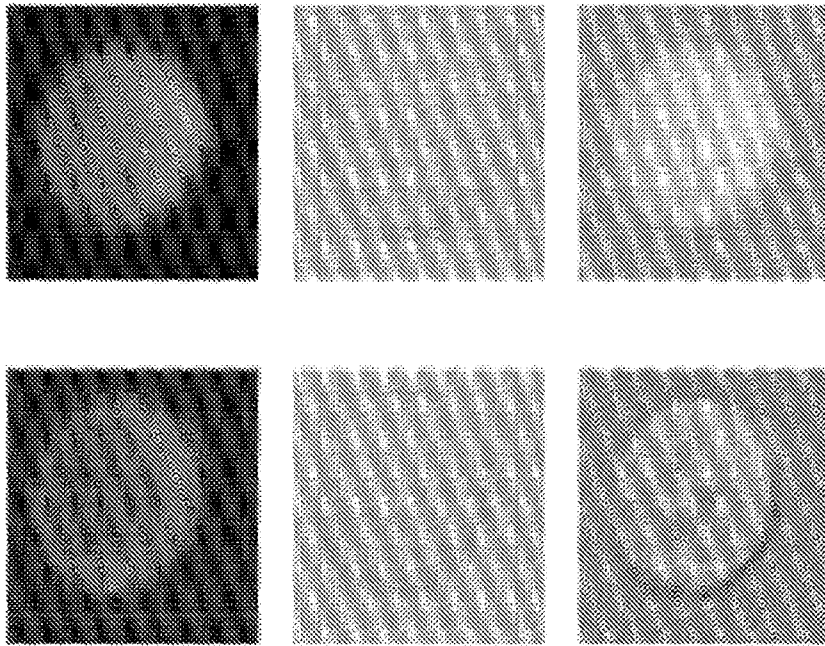


FIG. 8A

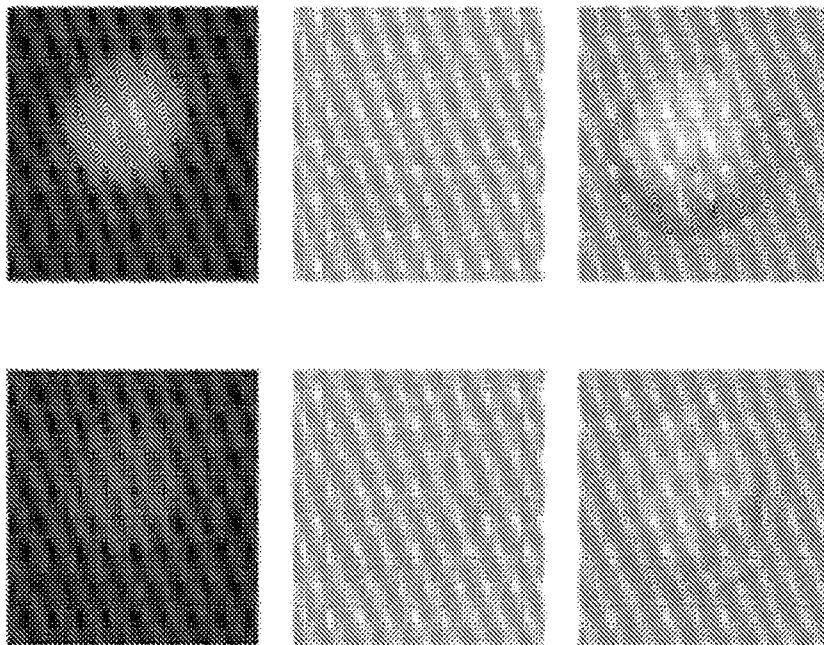


FIG. 8B

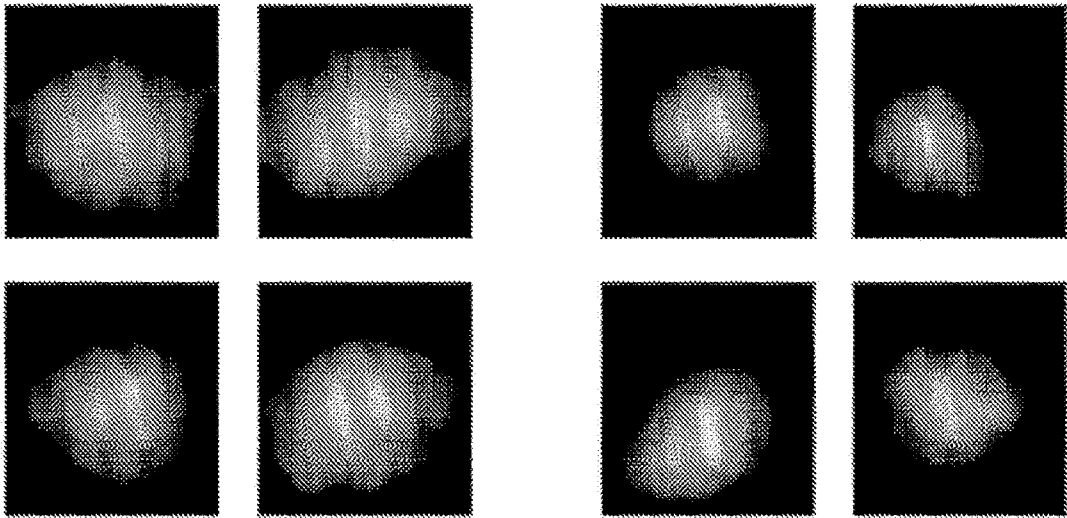


FIG. 9A

FIG. 9B

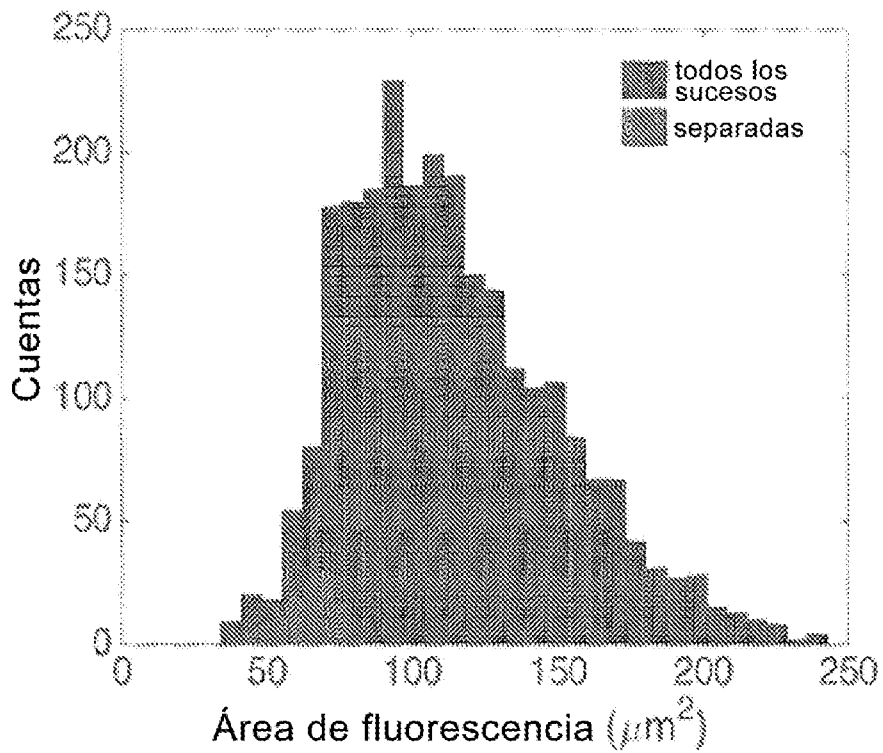


FIG. 10

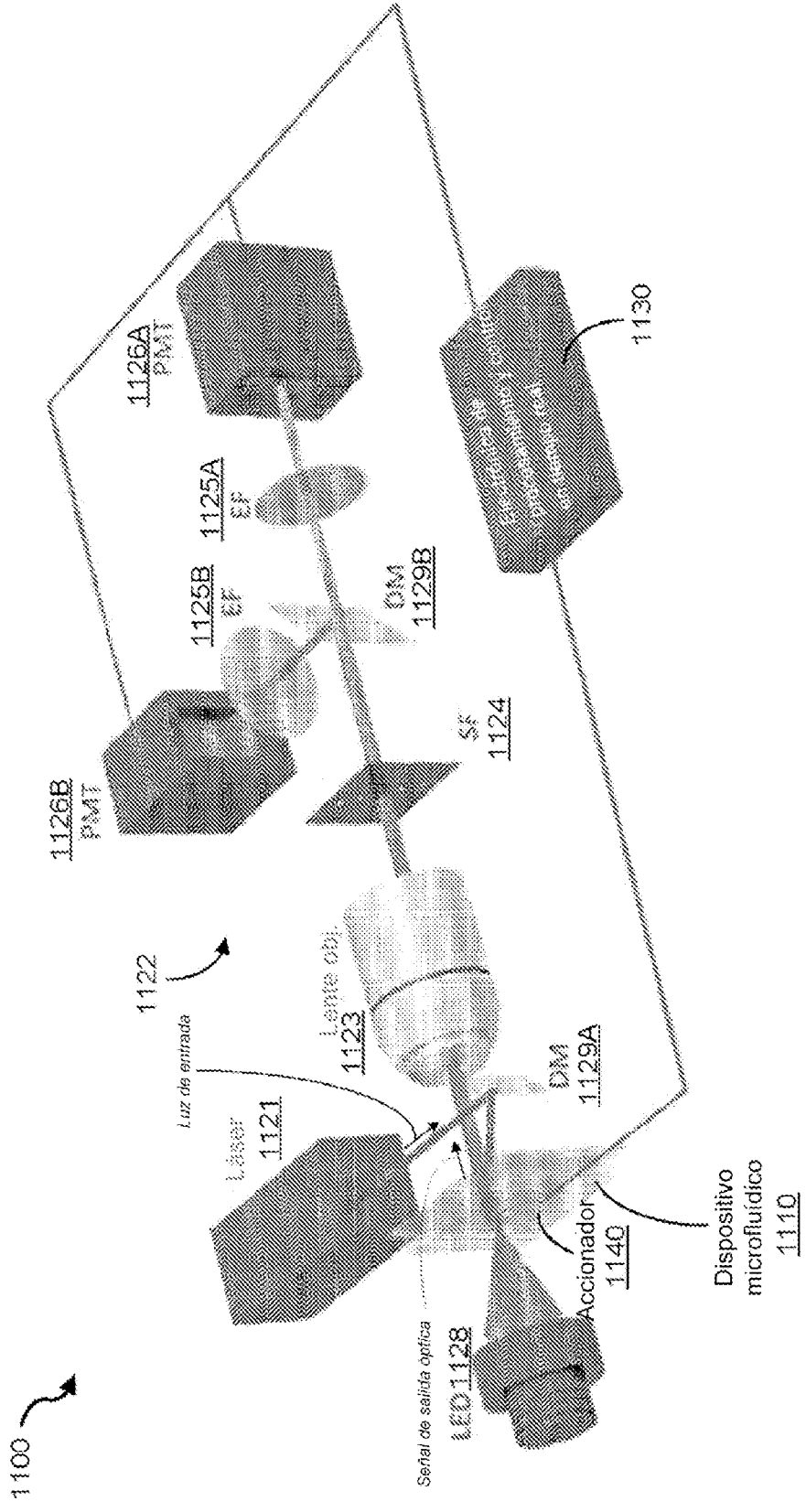


FIG. 11

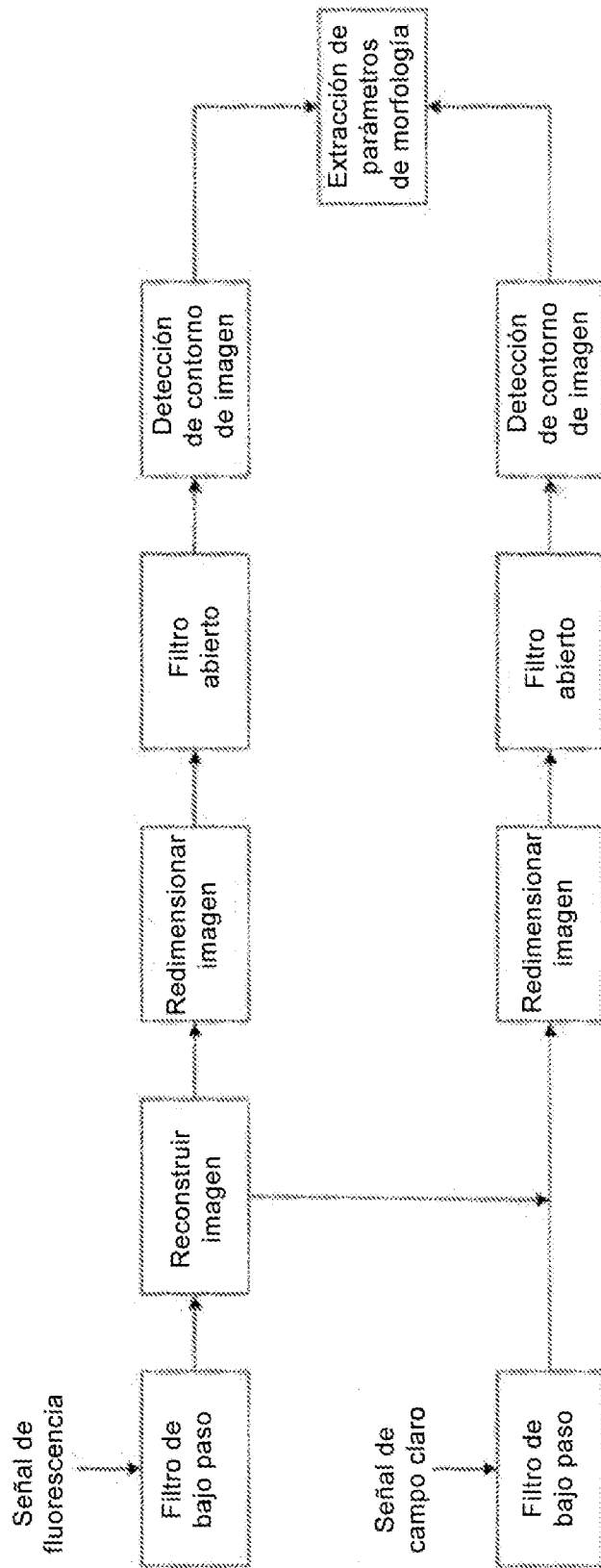


FIG. 12

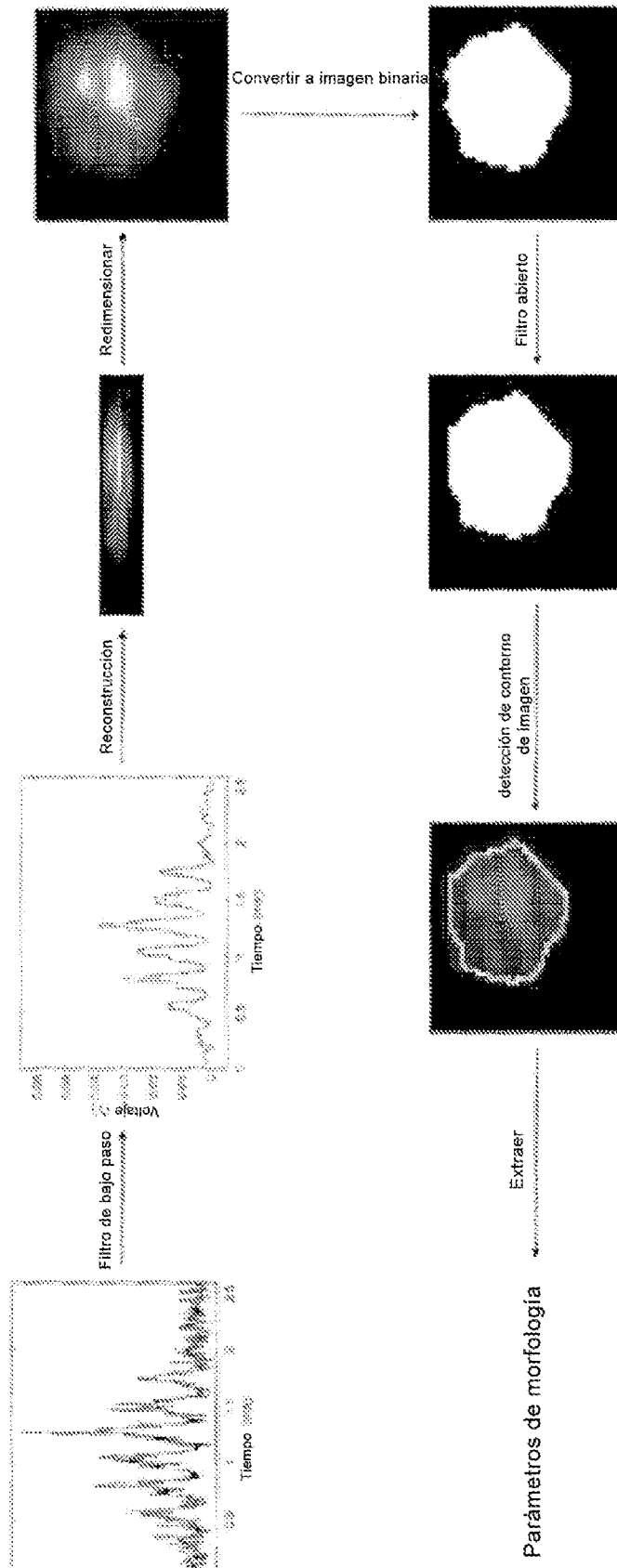


FIG. 13A

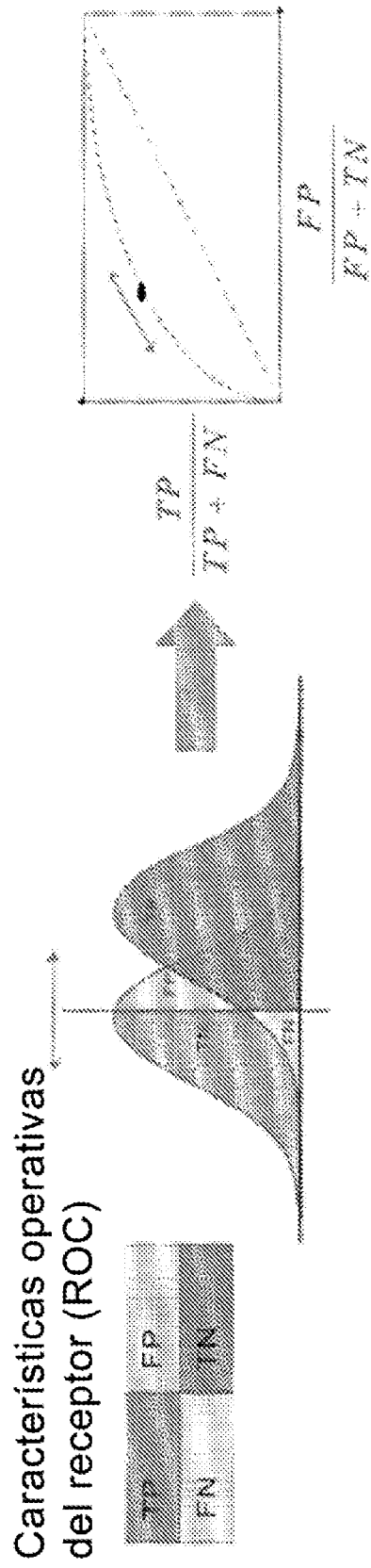


FIG. 13B

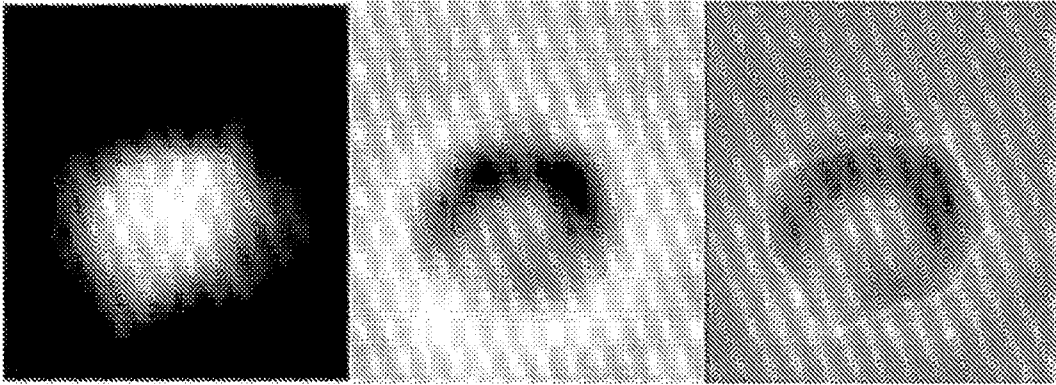


FIG. 14A

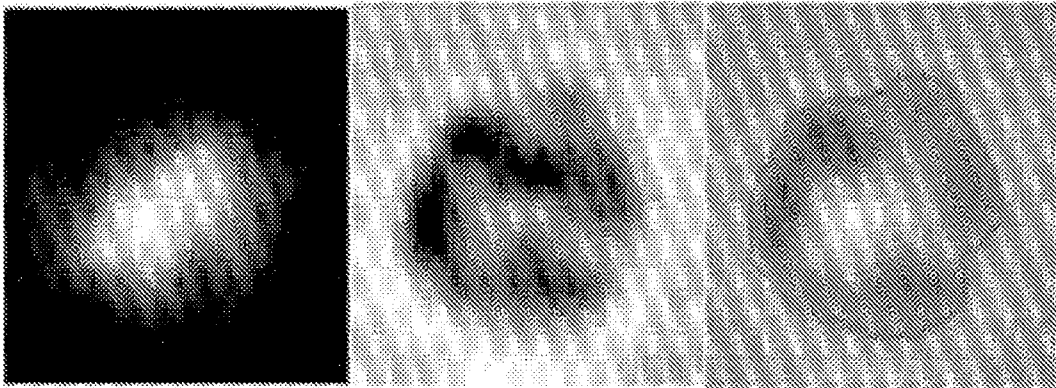


FIG. 14B

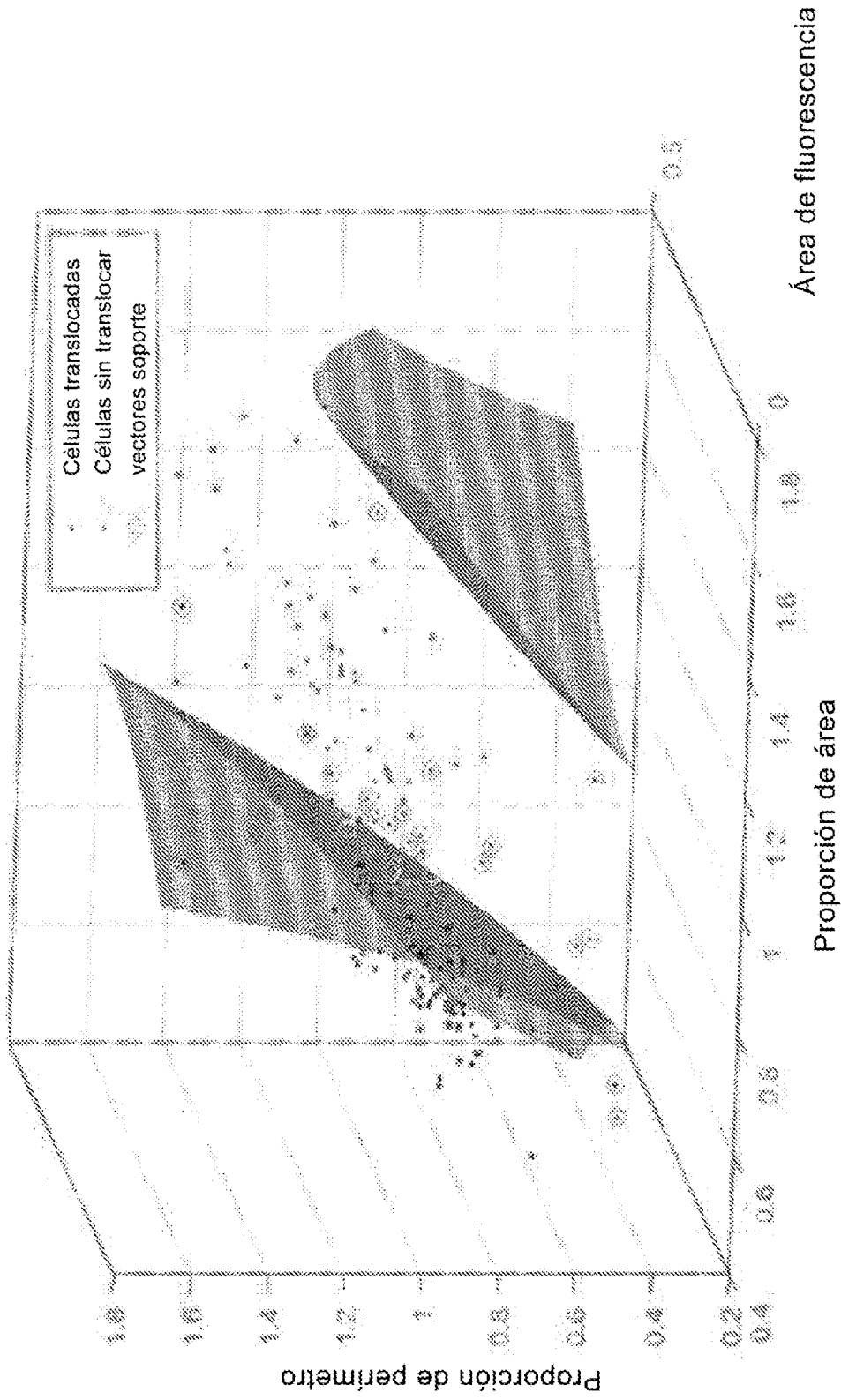


FIG. 15

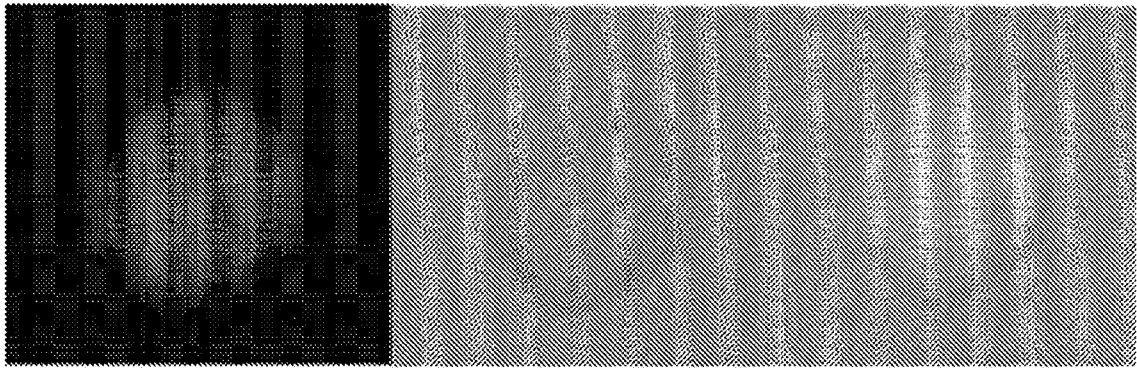


FIG. 16A

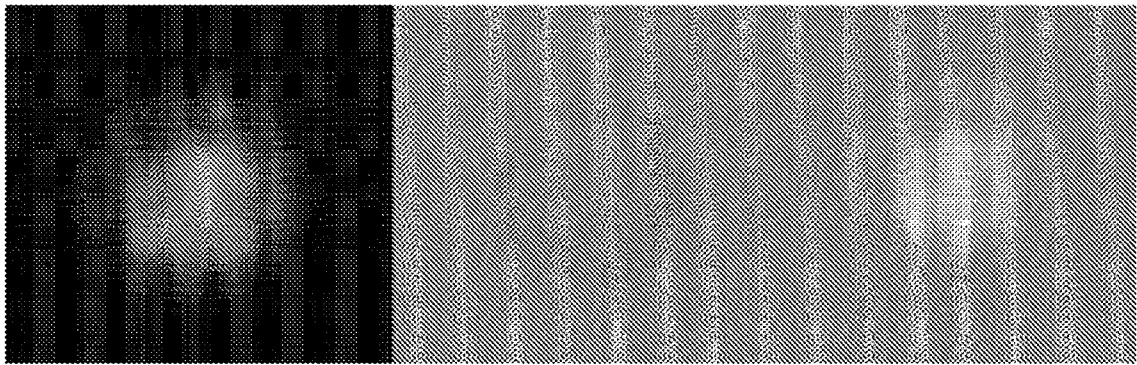


FIG. 16B

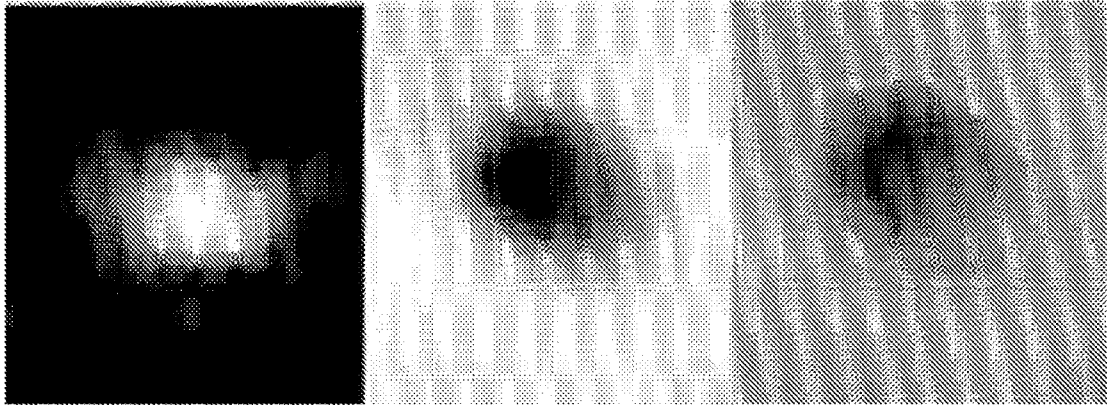


FIG. 17A

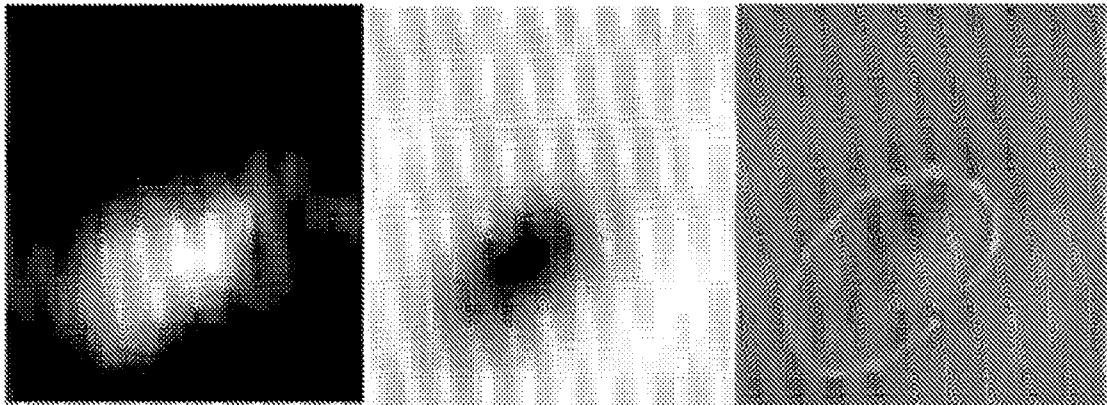


FIG. 17B

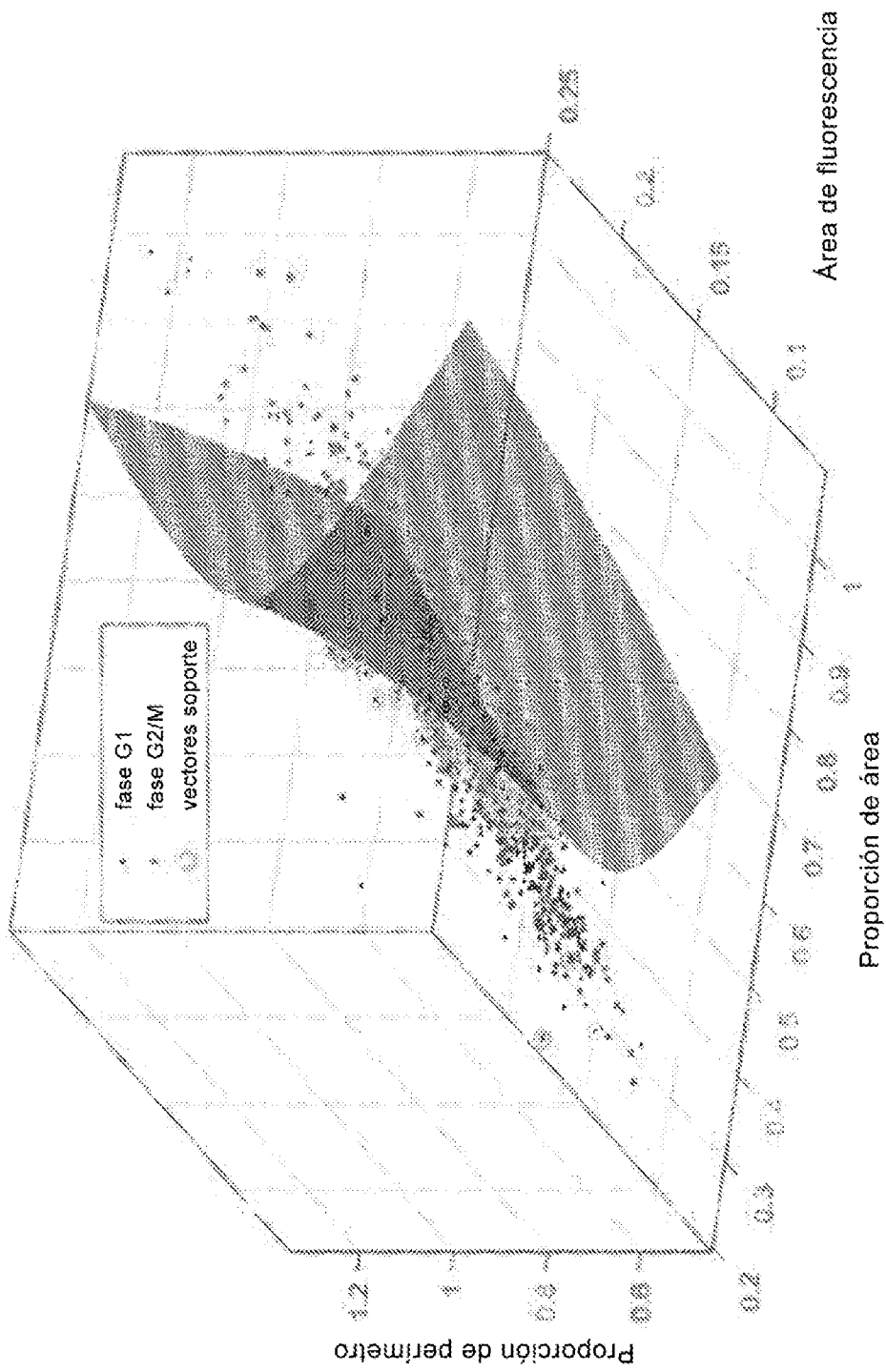


FIG. 18

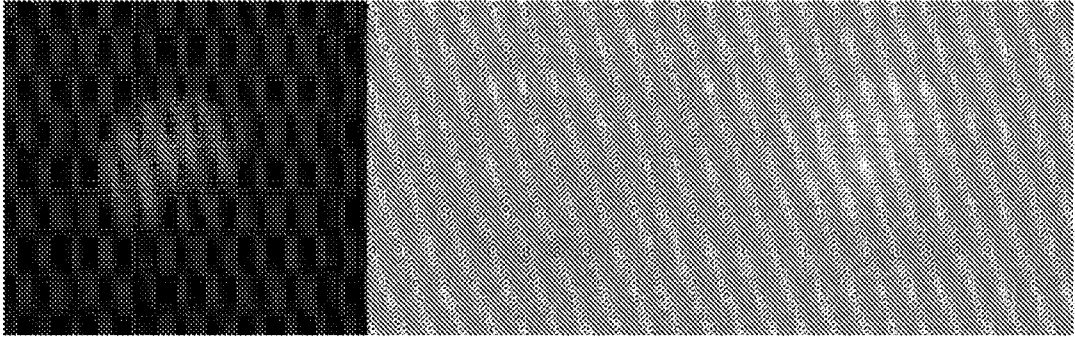


FIG. 19A

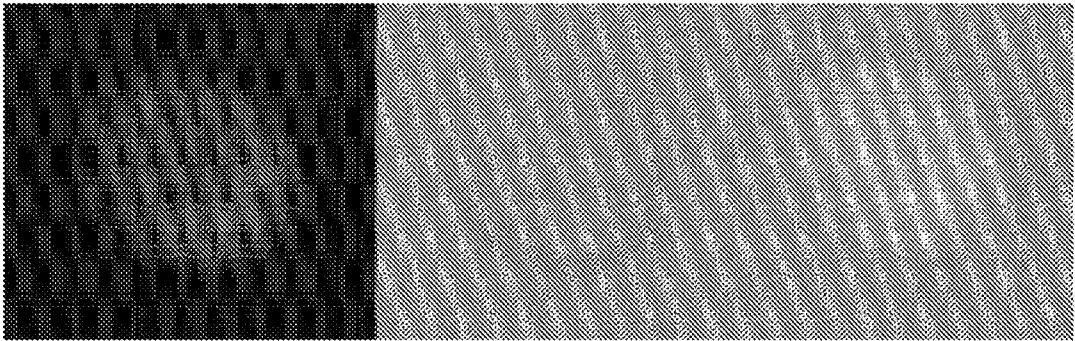


FIG. 19B

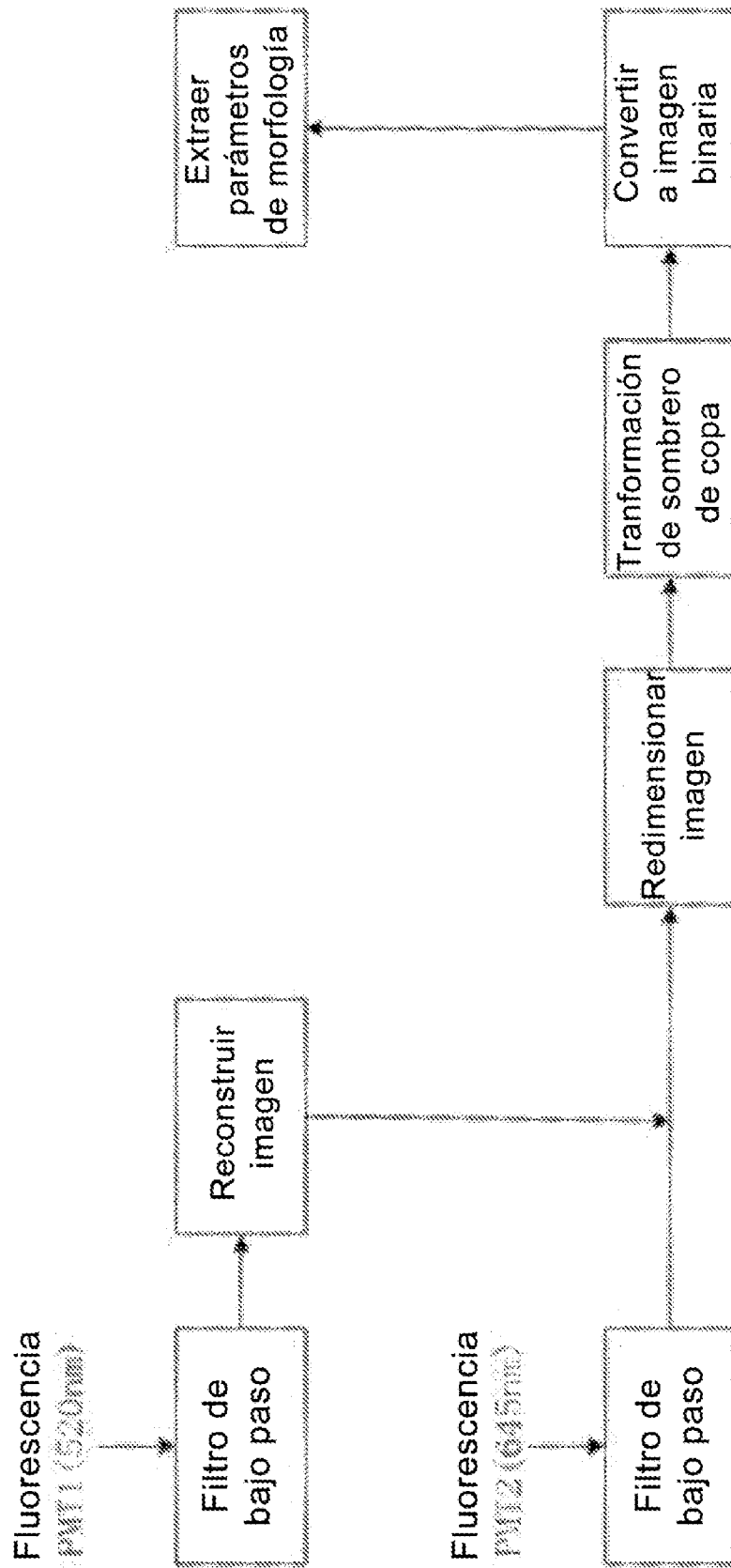


FIG. 20

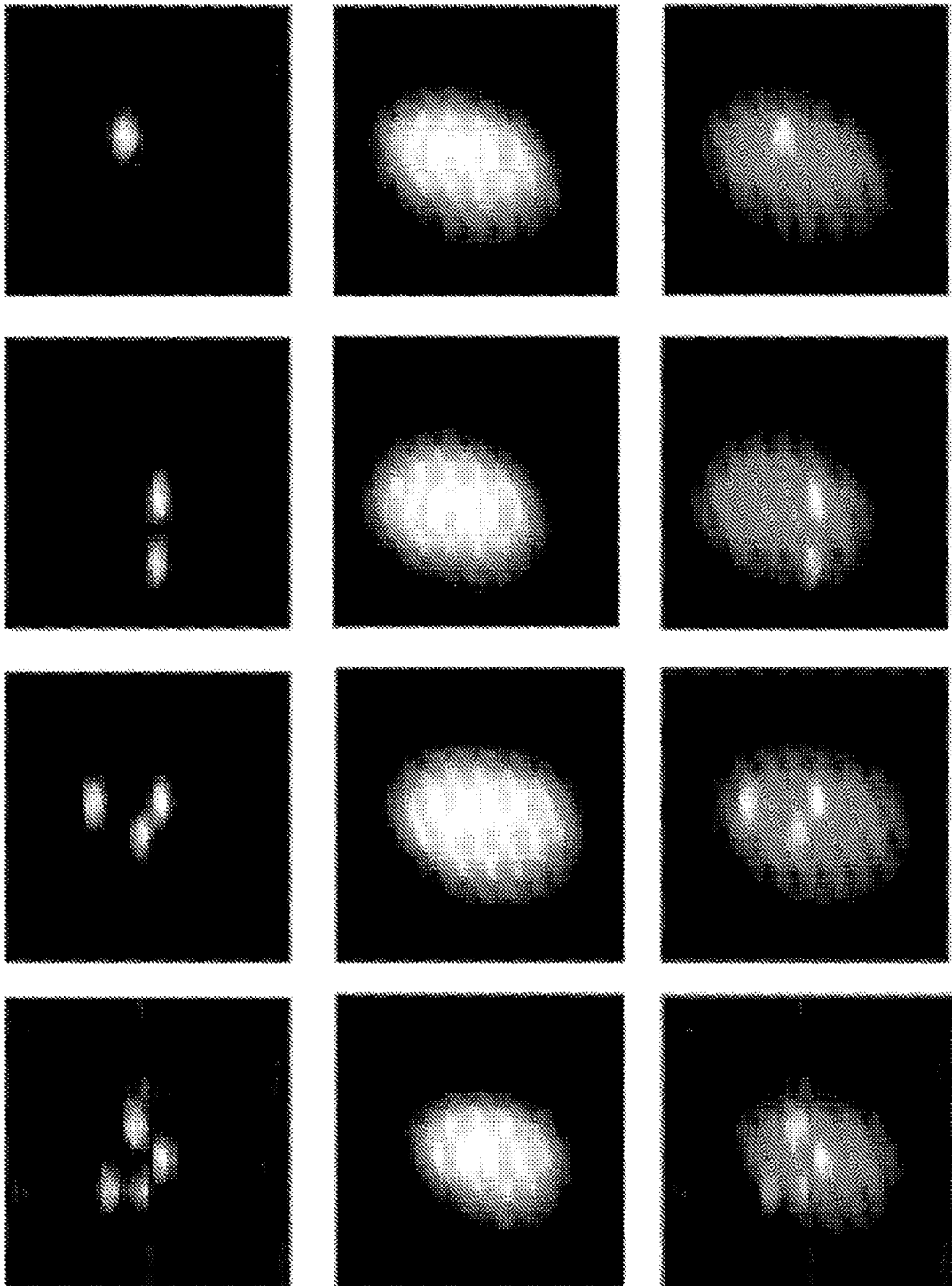


FIG. 21

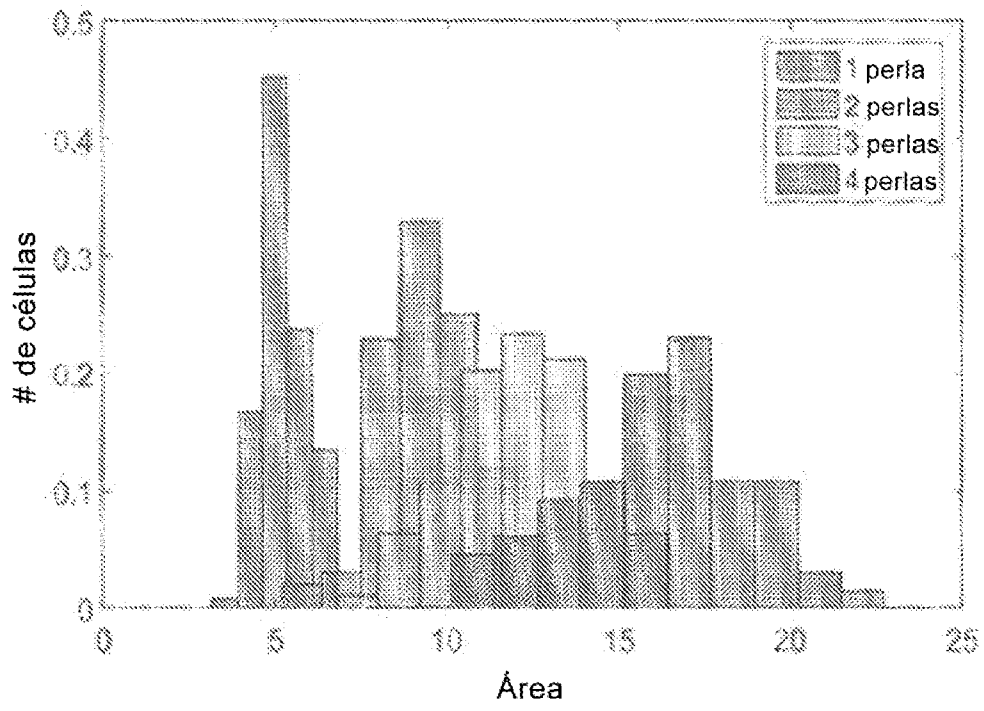


FIG. 22