

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 885 374**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2009 PCT/US2009/043752**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO09151858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2009 E 09763149 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.06.2021 EP 2277024**

54 Título: **Funcionamiento del citómetro de flujo de alto rendimiento con evaluación y control de calidad de datos**

30 Prioridad:

15.05.2008 US 127909

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

13.12.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DUNNE, JOHN;
PETRY, DOUGLAS y
IYER, SUJATA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 885 374 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

Funcionamiento del citómetro de flujo de alto rendimiento con evaluación y control de calidad de datos

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º 61/127.909, presentada el 15 de mayo de 2008.

5 Antecedentes

Muchas aplicaciones de la citometría de flujo requieren la manipulación y el análisis repetitivos de un gran número de muestras, particularmente en las áreas de supervisión ambiental, las pruebas clínicas y el descubrimiento de fármacos, u operaciones de clasificación de larga duración para obtener poblaciones purificadas de células poco comunes para uso médico, p. ej., Ibrahim y van den Engh, *Adv. Biochem. Biotechnol.*, 106: 19-39 (2007); Johnson *et al*, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 8: 133-139 (2007); Sugiyama *et al*, *Diabetes Obes. Metab.*, 10 Suppl. 4: 179-185 (2008); Janossy y Shapiro, *Cytometry Part B*, 74B (Suppl. 1): S6-S10 (2008); Krutzik *et al*, *Nature Chemical Biology*, 4: 132-142 (2008); Szczepanski *et al*, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 44: 775-796 (2006); Rutten *et al*, *Cytometry A*, 64: 16-26 (2005); Campana, *Am. J. Clin. Pathol.*, 122 (Suppl.): S47-S57 (2004); y similares. Es altamente deseable un funcionamiento de alto rendimiento y "de ausencia" de sistemas de flujo complejos en tales contextos, pero plantean desafíos únicos de ingeniería y de control de procesos, tales como (i) preparar y poner en cola múltiples muestras para su análisis en serie, (ii) mantener la alineación y el funcionamiento adecuado de los componentes de instrumento durante períodos prolongados de funcionamiento para garantizar la consistencia de las mediciones de muestra a muestra o para evitar la pérdida de subpoblaciones poco comunes, (iii) análisis de muestras que varían ampliamente en origen y calidad, especialmente en entornos clínicos, y (iv) reconocer y responder a eventos que afecten las funciones de sistema de flujo, que dan como resultado mediciones anómalas.

Sería deseable para el funcionamiento de alto rendimiento y sin supervisión de los sistemas de flujo si tales sistemas tuvieran la capacidad de autosupervisarse y tomar acciones correctivas automáticas en respuesta a las condiciones, p. ej., la obstrucción de los tubos de muestra, la desalineación de los haces de iluminación, la degradación de la muestra, o similares, las cuales pueden comprometer la calidad y la integridad de los datos recopilados o la pureza de las poblaciones de células aisladas.

La patente europea EP 0 737 855 B1 describe un analizador de partículas fluorescentes con alineación temporal para la sustracción de pulsos analógicos de pulsos fluorescentes que surgen de diferentes ubicaciones de excitación.

El documento WO 99/44037 A1 describe un citómetro de flujo capaz de utilizar un sistema de formación de imágenes que incluye un sensor para determinar diversas propiedades del citómetro de flujo.

La patente europea EP 1 291 641 B1 describe un sistema de celda de flujo para pruebas de solubilidad de alto rendimiento de compuestos. Los datos de dispersión de las partículas se almacenan y las variaciones en la señal se determinan en tiempo real. Los valores de referencia de una sustancia de control de concentración conocida y tamaño de partículas uniforme, que se intercala regularmente en el dispositivo, se utilizan para evaluar la alineación de la corriente de líquido de muestra en la celda de flujo. Esto permite la detección automática de desviaciones y la consiguiente acción correctiva.

El documento US 2005/015964 A1 describe métodos y sistemas para expandir el intervalo dinámico de un sistema.

El documento WO 99/58955 A1 describe un sistema de diagnóstico de analitos múltiples para su uso con un ordenador y que incluye un analizador de flujo que se puede comunicar con el ordenador. El analizador de flujo incluye una matriz de detector óptico de fuente de luz coplanar.

40 Compendio de la invención

La invención proporciona un sistema de flujo y un método para un alto rendimiento fiable y/o una recopilación desatendida de datos multiparamétricos de una o más muestras. En un aspecto, la invención incluye un sistema de flujo según la reivindicación 1. En otro aspecto, la invención proporciona un método según la reivindicación 19.

La presente invención supera los problemas asociados con la recopilación de datos y la clasificación y enumeración de partículas en sistemas de citometría de flujo que funcionan durante períodos prolongados o que se deben adaptar a muestras que varían ampliamente en calidad. En particular, los problemas de fluidos, tales como la turbulencia, la variación en los caudales debido a burbujas u otras oclusiones, y los problemas de calidad de la muestra, tales como la aglutinación o la agregación de muestras, y similares, requieren una atención casi continua por parte del operario para evitarlas. De conformidad con la invención, los datos se supervisan automáticamente de modo que se pueda determinar si las mediciones en diferentes momentos difieren en maneras que probablemente no se esperan biológica o experimentalmente y si se debería tomar una acción correctiva. De conformidad con una realización preferida de la invención, tal supervisión y evaluación se realiza en células biológicas en muestras que se analizan. Los conjuntos de datos se analizan en tiempo real utilizando un método que reconoce patrones de comportamiento fluídico mediante la supervisión de varios indicadores de varianza en los datos y su comparación con los límites de tolerancia seleccionados por un usuario, de tal manera que siempre que se detecten valores de datos atípicos se tomen acciones

correctivas, incluyendo, pero sin limitación, purgar secciones seleccionadas del sistema de fluidica, anotar los valores de datos afectados, notificar a un operario, omitir una muestra de una secuencia de muestras múltiples, ajustar las compuertas de clasificación y/o enumeración, o similares.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1A ilustra los valores promedio y la primera y la segunda desviaciones estándar de la magnitud de un único componente de un punto de datos como funciones de tiempo e intervalos de tiempo durante los cuales se supervisa.
La Figura 1B ilustra cómo tales funciones pueden cambiar en respuesta a una obstrucción en la fluidica de un sistema de flujo.
- 10 La Figura 1C es un diagrama de flujo que ilustra el funcionamiento de un sistema de flujo de conformidad con la invención.
Las Figuras 1D-1F muestra un diagrama de dispersión de datos bidimensionales y una cuadrícula de regiones de recopilación dentro de las cuales se cuentan los eventos y se comparan a lo largo del tiempo para supervisar los cambios cualitativos en cómo se distribuyen los puntos de datos en el diagrama.
- 15 Las Figuras 1G-1H muestran un diagrama de dispersión de puntos de datos bidimensionales y una realización de una pluralidad de subconjuntos disjuntos predeterminados de puntos de datos bidimensionales para supervisar cambios en cómo se distribuyen los puntos de datos en el diagrama a lo largo del tiempo.
La Figura 1I es un gráfico de barras que muestra el cambio en el número de puntos de datos acumulados en regiones seleccionadas durante dos intervalos de recopilación diferentes.
- Las Figuras 1J-1L ilustran esquemáticamente diferentes aspectos de los sistemas de citómetro de flujo.
- 20 La Figura 2A es una captura de pantalla de una interfaz gráfica de usuario de una realización de la invención.
La Figura 2B es otra captura de pantalla de la interfaz gráfica de usuario de la realización de la Figura 2A que muestra datos generados a partir de configuraciones de usuario alternativas.

Descripción detallada de la invención

- 25 La práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de citometría de flujo, biología celular y molecular, tecnología de inmunoensayo, microscopía, análisis de imágenes, y química analítica, que se encuentran dentro del conocimiento de la técnica. Tales técnicas convencionales incluyen, pero sin limitarse a, marcado de células biológicas, inmunomarcaje de células biológicas, detección de señales fluorescentes, análisis de imágenes, selección de fuentes de iluminación y componentes de detección de señales ópticas, y similares. Tales técnicas y descripciones convencionales se pueden encontrar en manuales de laboratorio estándar tales como Robinson *et al* (Editores) Current Protocols in Cytometry (John Wiley & Sons, 2007); Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cells: A Laboratory Manual, (ambos de Cold Spring Harbor Laboratory Press); Owens *et al* (Editores), Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice: Quality Assurance for Quantitative Immunophenotyping (Wiley-Liss, 1994); Ormerod (Editor) Flow Cytometry: A Practical Approach (Oxford University Press, 2000); Coon, Diagnostic Flow Cytometry (Williams & Wilkins, 1991); Riley *et al*, Clinical Applications of Flow Cytometry (Igaku-Shoin Medical Publication, 1993); Stewart y Nicholson (Editores) Immunophenotyping (Wiley-Liss, 2000); Murphy, Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging (Wiley-Liss, 2001); Shapiro, Practical Flow Cytometry, Cuarta Edición (Wiley-Liss, 2003); Herman *et al*, Fluorescence Microscopy, 2.^a Edición (Springer, 1998).
- 35 En un aspecto, los sistemas de flujo de la invención proporcionan una recopilación fiable de puntos de datos multiparamétricos mediante la supervisión de cambios en los patrones de los datos recopilados y la implementación automáticamente de una o más acciones correctivas si tales cambios van más allá de los límites predeterminados.
- 40 Tales acciones correctivas pueden incluir una o más de las acciones que figuran en la siguiente tabla:

Acciones correctivas a modo de ejemplo

detener la adquisición	ejecutar la muestra de QC/de calibración
lavar la celda de flujo	volver a ejecutar la última muestra válida
purgar la línea de muestra	extraer el gas de la celda de flujo
volver a ejecutar la muestra	reanudar la electrónica

Acciones correctivas a modo de ejemplo

guardar la muestra actual	reiniciar el software
omitir la muestra	anotar los datos fallidos
apagar el sistema	ajustar las compuertas
ponerse en contacto con el operario	
hacer sonar una alarma	

Los datos multiparamétricos se recopilan en intervalos de tiempo separados, como se ilustra en la Figura 1A, donde la magnitud de solamente un único componente, tal como la intensidad de la dispersión frontal, de tales datos multiparamétricos se traza a lo largo del tiempo. (Habitualmente, un punto de datos multiparamétricos incluye unos valores de señal para las intensidades de ambas señales de dispersión, así como para varias señales fluorescentes separadas, p. ej., de 1 a 8, o más). En esta ilustración, el subconjunto predeterminado dentro del cual se recopilan los datos en los intervalos de tiempo está definido por los confines superior e inferior, (13) y (15), respectivamente, el perfil de datos es sencillamente el número de partículas cuya magnitud de componente único se encuentra dentro de los confines superior e inferior (13) y (15), y la característica del perfil de datos es el valor promedio de la componente única de las partículas contadas. En condiciones normales de funcionamiento, cada valor de la componente caerá dentro de una distribución que tiene un valor promedio (10) (que puede ser el mismo o diferente a la característica calculada del perfil de datos), y, por ejemplo, una primera (12) y una segunda (14) desviaciones estándar. Cualquiera de estas cantidades también se podría utilizar como una característica que supervise el sistema. Como se ilustra en la Figura 1A, durante cada uno de los intervalos de tiempo separados (16), los puntos de datos multiparamétricos se recopilan a partir de subconjuntos predeterminados del espacio de datos multiparamétricos o un subespacio de este, tal como una proyección sobre un espacio bidimensional (que no se muestran en las Figuras 1A-1B; únicamente se muestra la magnitud de un único componente). Preferiblemente, los intervalos (16) están espaciados uniformemente dentro del período de funcionamiento del sistema de flujo; y, más preferiblemente, están espaciados regularmente, es decir, con períodos de tiempo iguales entre intervalos. Las longitudes de intervalo dependen de la tasa a la que se detectan los eventos o las partículas. Las tasas de recopilación lentas de puntos de datos requieren más tiempo para recopilar un número estadísticamente significativo de puntos de datos para determinar cambios significativos en un perfil de datos o medidas basadas en él. De manera similar, las tasas de recopilación más altas permiten longitudes de intervalo más cortas. Para tasas habituales de recopilación de puntos de datos en el intervalo de desde unos pocos miles por segundo hasta muchas decenas de miles por segundo, las longitudes de intervalo están preferiblemente en el intervalo de desde 1 hasta 20 segundos. Si bien la Figura 1A ilustra los intervalos (16) como espaciados entre sí, preferiblemente los intervalos son contiguos, de modo que no exista "tiempo muerto" entre intervalos (16).

De manera alternativa, o de manera complementaria a las evaluaciones a intervalos de tiempo regulares, donde se analizan múltiples muestras en una única operación, también se pueden realizar evaluaciones adicionales de muestra a muestra, por ejemplo, al comienzo del análisis de cada muestra. Por ejemplo, si las muestras de una pluralidad de muestras, p. ej., dispuestas en diferentes pocillos de placas de microvaloración, se espera que tengan todas los mismos tipos de células, entonces se puede interrogar inicialmente a una compuerta de agrupación correspondiente para su presencia o ausencia o su concentración o cantidad.

Durante el funcionamiento de un sistema de flujo, se puede producir una obstrucción en el tubo de muestra, que desvía la trayectoria de la muestra fuera del haz de iluminación. La consecuencia de tal función anómala se puede representar como en la Figura 1B, donde, en el período de tiempo (18), los valores de señal han caído. Una caída de este tipo sería detectada por el sistema cuando una característica de los puntos de datos del intervalo de tiempo T_4 (20) se determina (o más completamente una característica del perfil de datos del intervalo de tiempo T_4 se determina) y (por ejemplo) se compara con la característica determinada para los puntos de datos del intervalo de tiempo T_3 (22). (De manera alternativa, un valor de característica se puede comparar con unos valores de límite (denominados "límites predeterminados" en la presente memoria), tal como están representados mediante los confines superior e inferior (13) y (15).) Al reconocer el cambio en el valor de señal (indirectamente calculando y comparando un valor de característica con sus valores de límite), el sistema inicia una acción correctiva (26), o una serie de acciones correctivas, con el fin de devolver el sistema a su estado de funcionamiento anterior, p. ej., el valor de señal promedio vuelve a su nivel medido previamente, o a dentro de algún nivel predeterminado. Una vez que se detecta un cambio de este tipo en los datos, los puntos de datos multiparamétricos se pueden supervisar a una frecuencia más alta (24) hasta que las características determinadas de los perfiles de datos vuelvan a un valor correspondiente al funcionamiento normal. Por supuesto, para la realización preferida, donde los intervalos de supervisión (16) son contiguos, esto no sería necesario.

El control de un funcionamiento de este tipo se puede representar mediante un diagrama de flujo, como se ilustra en la Figura 1C. Habitualmente, el funcionamiento comienza cuando un usuario selecciona unos subconjuntos de datos que se desean supervisar, la frecuencia y la duración de los intervalos de tiempo durante los cuales se recopilan puntos de datos multiparamétricos en los diversos subconjuntos, una característica de perfil de datos para determinar,

y tolerancias para el valor de la característica, o cambios en el valor de la característica (50). Estos valores se ingresan utilizando el *software* de sistema asociado con el sistema de flujo. Mientras el sistema de flujo está en funcionamiento, durante cada uno de una sucesión de intervalos de tiempo, los puntos de datos se recopilan en cada uno de los subconjuntos seleccionados y se calcula una característica del perfil de datos (52). El valor de la característica para el intervalo de tiempo actual se compara entonces con el del intervalo de tiempo anterior o con los límites de tolerancia seleccionados por el usuario (54). Si el valor excede el valor de la característica anterior en una cantidad predeterminada o si el valor excede los límites predeterminados, entonces se implementa una acción correctiva (56). Después de la acción correctiva, la característica de perfil de datos se determina de nuevo a partir de datos nuevos y su valor se compara de nuevo con valores anteriores o límites de tolerancia absolutos (58). Si el valor recién determinado de la característica de perfil de datos no se encuentra dentro de los confines aceptables, luego se repite la acción correctiva o se implementa una acción correctiva diferente. Si el valor recién determinado de la característica de perfil de datos se encuentra dentro de los confines adecuados, entonces el funcionamiento del sistema de flujo continúa y se recopila y analiza un nuevo conjunto de datos durante el siguiente intervalo de tiempo. El proceso continúa durante un número predeterminado de intervalos de tiempo después de los cuales se toma una acción más drástica, tal como detener el sistema, hacer sonar una alarma, notificar a un operario, o similares.

Los datos multiparamétricos comprenden un conjunto de valores correspondientes a señales medidas en respuesta al paso de una partícula a través de una o más estaciones de detección de un sistema de flujo. Un conjunto de valores de este tipo se puede ver como un punto en un espacio de datos multidimensionales. Un punto de datos multiparamétricos también puede incluir el momento en el que se recopiló el conjunto de valores de señal que constituyen el punto de datos. El valor de tiempo se puede utilizar para supervisar la tasa de eventos, que es la tasa a la que se detectan partículas en una estación de detección durante el funcionamiento. Los cambios en la tasa de eventos se pueden supervisar junto con los subconjuntos predeterminados de la invención y correlacionarse con problemas en el sistema de fluidica, como enseña Watson, *Cytometry*, 8: 646-649 (1987).

En otra realización de la invención, el valor de la fluorescencia libre en el fluido de muestra (o corriente adyacente a una partícula) se puede incluir como una componente de un punto de datos multiparamétricos. Este valor también se puede supervisar por separado. El valor se obtiene midiéndolo a través del sistema de detección de fluorescencia habitual de un sistema de flujo. Tal medición se realiza a través del sistema de detección confocal del sistema de flujo que dirige la fluorescencia recopilada a los PMT (tubos fotomultiplicadores, por las siglas en inglés de *photomultiplier tubes*) apropiados, u otros dispositivos de detección. A menudo, esta cantidad no se mide en el sistema de flujo de la técnica anterior, aunque su intensidad puede proporcionar información acerca del estado de la corriente de muestra en una columna de fluido en movimiento, indicando, por ejemplo, si está alineada correctamente para detectar partículas o si la corriente de muestra se está desviando debido a residuos en el sistema de fluidica u otros factores. Se puede emplear la medición de la intensidad de la fluorescencia libre de la corriente de muestra para evaluar si la corriente de muestra se ha desviado o si una obstrucción ha reducido su caudal. Se puede supervisar la fluorescencia total o uno o más intervalos de longitud de onda de fluorescencia. En algunos casos, donde los marcadores fluorescentes no se lavan después de la aplicación a una muestra, la fluorescencia libre supervisada puede corresponder a la banda o bandas de emisión de los marcadores fluorescentes.

Un usuario selecciona límites o intervalos predeterminados que definen qué puntos de datos multiparamétricos se cuentan con el propósito de supervisar los datos. Estos subconjuntos predeterminados de puntos de datos pueden ser los mismos o diferentes a las compuertas que se utilizan para clasificar o enumerar células o partículas como parte de un experimento u operación clínica. Los valores para tales límites o intervalos se pueden ingresar *a priori* o los valores se pueden ingresar en función de datos de una o más muestras preliminares. Los límites predeterminados se seleccionan como un cambio porcentual especificado por el usuario en la proporción de puntos de datos multiparamétricos contados en dos o más subconjuntos predeterminados, que pueden ser regiones disjuntas o regiones superpuestas especificadas por el usuario de espacio de datos multiparamétricos. Una realización a modo de ejemplo se ilustra en las Figuras 1D-1F para puntos de datos bidimensionales. Aquí, los datos se representan como un diagrama de puntos que contiene dos agrupaciones (100) y (102). En la Figura 1E, el espacio de datos se muestra dividido en una cuadrícula (104) de tal manera que cada celda de la cuadrícula (es decir, "celdas de cuadrícula" para distinguirlas de las "células biológicas"), tal como la celda B6 (106), o cualquier subconjunto de celdas, pueden servir como subconjuntos predeterminados con el propósito de formar un perfil de datos. Un perfil de datos es el número relativo de puntos de datos multiparamétricos en cada una de las celdas o subconjuntos de celdas que componen una recopilación de conjuntos predeterminados, que, en este ejemplo, son conjuntos predeterminados disjuntos. Si una obstrucción en un tubo de muestra desvía la trayectoria común de muestra de partículas de modo que cada partícula recopilada en el intervalo de tiempo 2 (Tiempo 2 en la Figura 1F) recibe únicamente una fracción de la iluminación que las recopiladas en el intervalo de tiempo 1 (Tiempo 1), entonces los valores de señal que definen los puntos de datos, p. ej., diferentes intensidades fluorescentes de colores, se puede desplazar como se ilustra mediante las flechas (108) y (110). Tal desplazamiento da como resultado la redistribución de los puntos de datos multiparamétricos entre las celdas de la cuadrícula (104) con respecto a tales puntos recopilados en el Tiempo 1 y tales puntos recopilados en el Tiempo 2. Los intervalos de tiempo para realizar tales comparaciones son predeterminados a menudo por un usuario y son preferiblemente lo suficientemente largos como para permitir la recopilación de una muestra de eventos que refleje de manera fiable el estado del instrumento. De manera alternativa, los cambios en la distribución de puntos de datos multiparamétricos se pueden supervisar analizando periódicamente los números predeterminados de eventos (en lugar de los intervalos de tiempo). En otras realizaciones a modo de ejemplo, los subconjuntos predeterminados

se pueden seleccionar automáticamente como un patrón de un número predeterminado de regiones disjuntas de un espacio de datos multiparamétricos. Tal patrón puede ser regular, p. ej., rectilíneo, radial, o no regular pero uniformemente espaciado. Por ejemplo, tales subconjuntos pueden incluir todas las celdas en una cuadrícula que cubre la totalidad de un espacio de datos, tal como las celdas A1, A2 ... E6 de la Figura 1E. Tales subconjuntos pueden ser una matriz espaciada rectilíneamente de regiones de igual volumen, cuyo volumen total es un porcentaje predeterminado del volumen total del espacio de datos; por ejemplo, una recopilación de subconjuntos puede ser cualquier otra celda de la cuadrícula de la Figura 1E, dispuesta en forma de tablero de ajedrez, cubriendo, de este modo, el cincuenta por ciento del espacio de datos total. En tales realizaciones a modo de ejemplo, el número de tales regiones puede oscilar desde 2 hasta 100, o desde 2 hasta 36, o desde 2 hasta 9; y el porcentaje de espacio de datos abarcado por la recopilación de tales subconjuntos puede oscilar desde 1 por ciento hasta 50 por ciento, o desde 1 por ciento hasta 10 por ciento, o desde 1 por ciento hasta 5 por ciento. De manera alternativa, se puede seleccionar un número mínimo de regiones que cubran una agrupación seleccionada, por ejemplo, las regiones B2, B3, C2, C3, D2 y D3, de la Figura 1E. Supervisar el número de puntos de datos recopilados en celdas de cuadrícula adyacentes es especialmente útil para detectar reducciones globales en el nivel de señal, tal como las provocadas por una corriente de muestra desviada, porque una disminución en el número de puntos de datos en una celda de cuadrícula va acompañada de un aumento correspondiente en el número de puntos de datos en una o más celdas de cuadrícula adyacentes.

La Figura 1G ilustra una realización a modo de ejemplo alternativa en donde la distribución de los puntos de datos multiparamétricos se supervisa en tres conjuntos predeterminados disjuntos I (114), II (116) y III (118). Los conjuntos predeterminados I (114) y II (116) encierran sustancialmente las agrupaciones (100) y (102), respectivamente. El conjunto predeterminado III (118) es sencillamente el área del espacio de datos fuera de los conjuntos I y II. Por lo tanto, la suma de los volúmenes de los tres subconjuntos (o la suma de las áreas, en esta ilustración) es igual al espacio de datos completo. La Figura 1H ilustra un posible cambio en la distribución de los puntos de datos que da como resultado que la agrupación (100) se desplace (122) hacia la parte inferior izquierda en el espacio de datos y la agrupación (102) se desplace (120) hacia la parte inferior izquierda en el espacio de datos, lo cual podría suceder, por ejemplo, por el desvío de la trayectoria de partícula fuera de un punto focal láser en una estación de detección debido a una obstrucción en el tubo de muestra. La Figura 1I es un gráfico de barras que ilustra los cambios en los puntos de datos multiparamétricos recopilados en los tres conjuntos predeterminados en dos intervalos diferentes antes y después del desplazamiento de la posición de las agrupaciones (100) y (102). Siempre que los valores, o los valores relativos, de tales recuentos cambian por cantidades predeterminadas por un usuario, el instrumento implementa automáticamente una acción correctiva, tal como detener la recopilación y/o clasificación de datos, purgar el tubo de muestra, y reanudar el flujo de muestra y la recopilación de datos. Como se ha mencionado anteriormente, una característica de la invención es la recopilación de puntos de datos dentro de subconjuntos predeterminados del espacio de datos en una sucesión de intervalos de tiempo y la generación de un perfil de datos para cada intervalo. Después de la recopilación de tales puntos de datos durante un intervalo, se genera un perfil de datos y se compara una característica del perfil de datos con la de un perfil de datos recopilado anteriormente. A menudo, el perfil de datos anterior es el correspondiente al intervalo inmediatamente anterior. En un aspecto, un perfil de datos es una lista de los números correspondientes a los puntos de datos contados dentro de los términos de cada uno de los subconjuntos predeterminados. Una característica de un perfil de datos puede ser el propio perfil de datos, o puede ser uno o más números derivados de él que representan la información contenida en el perfil de datos. Por ejemplo, una característica puede ser la suma o el promedio de partículas enumeradas en diferentes subconjuntos predeterminados durante un intervalo. En otro ejemplo, un subconjunto predeterminado puede ser una región (tal como la región I (114) o la región II (116) de la Figura 1G) definida con respecto a una agrupación de puntos de datos. Una característica de un subconjunto de este tipo puede ser el centro de gravedad de los puntos de datos dentro de sus términos, que, en el caso de la Figura 1F, sería un par ordenado de números. El número de dimensiones utilizadas para definir tales subconjuntos puede ser 1 o 2, como se muestra, o más, y una implementación común puede incluir hasta 20 dimensiones medidas, y derivadas matemáticas de esas dimensiones medidas.

I. Sistemas de flujo.

Los sistemas de flujo pueden tener una variedad de diseños, que pueden incluir clasificadores de corriente en aire, analizadores de citometría de flujo sin capacidad de clasificación, analizadores y clasificadores basados en microfluidica, y similares. En general, los sistemas de flujo comprenden como componentes un sistema de fluidica, un sistema de detección, y un sistema de control que controla y coordina el funcionamiento del sistema de fluidica y el sistema de detección. Los sistemas de flujo miden las propiedades de las partículas suspendidas en un fluido; por lo tanto, un propósito de un sistema fluidico es proporcionar una trayectoria y una fuerza motriz para transportar partículas en una muestra a, o pasar por, una ubicación para ser interrogadas por un sistema de detección. Un sistema de fluidica puede tener muchos diseños, que oscilan desde el transporte de fluidos basado en pipetas mediante robots, hasta sistemas de conductos de fluidos especializados, p. ej., tuberías, colectores, y similares, válvulas, y dispositivos de movimiento de fluidos, p. ej., presión, gravedad, bombas, y similares. Los aspectos a modo de ejemplo de los sistemas de fluidica se ilustran en las Figuras 1J-1L. En un aspecto, los sistemas de fluidica incluyen una cámara o cubeta de flujo para producir una columna en movimiento de fluido envolvente en la que se inserta el fluido de muestra de modo que se produzca un flujo coaxial de envoltura y muestra, restringiendo, de este modo, las partículas de la muestra a viajar a lo largo de una trayectoria colineal. Los sistemas de detección comprenden unos dispositivos para interrogar y detectar señales a partir de las partículas que atraviesan una estación de detección, es decir, una ubicación en el

sistema de flujo donde los dispositivos de iluminación, los detectores de luz, y similares, están dispuestos de manera operativa. En un aspecto, los sistemas de detección de los sistemas de flujo incluyen unos dispositivos de iluminación, a menudo uno o más láseres, un detector de dispersión de luz frontal, un detector de dispersión de luz lateral, un microscopio confocal orientado a detectar señales de partículas en una trayectoria de flujo común en el plano confocal del microscopio. En una realización a modo de ejemplo, las señales recopiladas por el microscopio se detectan con tubos fotomultiplicadores (PMT), después de lo cual se filtran electrónicamente y digitalmente para eliminar señales o ruidos no deseados. Los sistemas de control son microprocesadores y componentes electrónicos asociados, un *software*, y una interfaz de usuario para controlar los diversos componentes del sistema de fluidica y el sistema de detección y para llevar a cabo las funciones del sistema de flujo.

En un aspecto, el flujo incluye unos sistemas para el enfoque hidrodinámico de la muestra mediante flujos envolventes. Tales sistemas pueden tener capacidad de clasificación, que pueden emplear una variedad de diseños de cámara de flujo (también denominadas, de manera alternativa, celdas de flujo o cubetas de flujo), o boquillas. Las celdas de flujo pueden tener una o más estaciones de detección para recopilar puntos de datos multiparamétricos y, de la misma manera, en sistemas que utilizan boquillas, una o más estaciones de detección pueden estar dispuestas a lo largo de un chorro o corriente emergente. Preferiblemente, los datos multiparamétricos se derivan a partir de múltiples señales ópticas, especialmente las señales de fluorescencia o de luz dispersa, recopiladas a partir de la misma partícula que pasa por la una o más estaciones de detección de un sistema de flujo. La Figura 1J ilustra esquemáticamente un sistema de flujo habitual de conformidad con un aspecto de la invención. La muestra se puede tomar de la placa de múltiples pocillos (184) mediante el tubo de selección de muestra (178) asociado funcionalmente con el aparato selector de muestras (176) bajo el control del procesador de sistema, o el sistema de control (162). La muestra se transporta a través de la línea de muestra (180) hasta la entrada de muestra, o tubo, (152), que (en esta realización particular) inserta la muestra en una columna de fluido que comprende un fluido envolvente (155) que restringe hidrodinámicamente las partículas de la muestra para que se muevan a lo largo de la trayectoria común de muestra (154). El fluido envolvente del depósito (174) ingresa a la celda de flujo (150) por el tubo de entrada (170). Las partículas en la muestra, que pueden comprender células biológicas y/o perlas, atraviesan una o más estaciones de detección (156) donde las señales son detectadas por múltiples detectores, p. ej., como se ilustra mediante el detector (158), y se convierten en valores de señal que constituyen puntos de datos multiparamétricos, que son almacenados por el procesador de sistema (162), o un ordenador auxiliar o dispositivo de almacenamiento conectado funcionalmente al procesador de sistema (162). Después de pasar por la estación de detección (156), la muestra sale de la celda de flujo (150) a través de la salida (164) y se deposita en el recipiente de desechos (166). El sistema de flujo también puede incluir un sistema de purgado de fluido para redirigir las trayectorias de fluido en la celda de flujo (150) o para introducir reactivos de limpieza en la celda de flujo (150), o ambos. Un sistema de purgado de fluido puede comprender un tubo (168) conectado funcionalmente al depósito (172) de fluido que puede ser el mismo que el fluido envolvente o que puede ser un reactivo de limpieza. La dirección del flujo de fluido a través del tubo (168) puede ser en cualquier dirección y está bajo el control del procesador de sistema (162). El sistema de purgado también puede incluir una válvula (182) bajo el control del procesador de sistema (162) para permitir que el flujo de fluido a través del tubo (152) se invierta y se dirija hacia un depósito de fluido de purgado o un depósito de desechos. En un aspecto de la invención, donde se utiliza un sistema de flujo como se ha descrito anteriormente para procesar múltiples muestras de manera automatizada, cuando las características de los perfiles de datos sucesivos cambian en más de una cantidad predeterminada, una acción correctiva puede comprender interrumpir la recopilación de datos, purgar el tubo de muestra, reiniciar la transferencia de muestra desde el pocillo de muestra actual (o, de manera alternativa, omitir el pocillo de muestra actual y pasar al siguiente pocillo de muestra), y reanudar la recopilación de datos. La Figura 1K ilustra esquemáticamente los componentes de un sistema de fluidica de un citómetro de flujo con capacidad de clasificación de corriente en aire. El tanque o depósito de envoltura (50) está presurizado (52) de modo que el fluido envolvente es conducido hacia la boquilla (54). De manera similar, el fluido de muestra en el tubo de muestra (56) está presurizado (58) de modo que el fluido de muestra es conducido hacia la boquilla (54) a través del tubo de muestra (60). Las presiones de fluido envolvente y de muestra se seleccionan de modo que una corriente estrecha de fluido de muestra fluya desde el tubo de muestra (60), lo cual restringe a las partículas dentro del fluido de muestra a moverse colinealmente a través de la boquilla (54) y la región de detección (62). Una operación de purgado se efectúa en un sistema de este tipo mediante el ajuste de la diferencia de presión entre la envoltura y los fluidos de muestra de modo que el flujo del fluido de muestra se invierta y el fluido envolvente sea conducido hacia el interior y a través del tubo de muestra (56). Un sistema de purgado alternativo habitual para los sistemas de corriente en aire provoca una presión negativa en la boquilla de flujo con respecto al exterior de la boquilla, de tal manera que el aire es aspirado a través de la abertura de boquilla. La rápida inversión de esta presión relativa provoca flujos de aire y envolventes en serie y opuestos, utilizada comúnmente para desalojar partículas que se pueden acumular en el orificio de boquilla u otra superficie interior. La Figura 1L ilustra esquemáticamente los componentes de un sistema de clasificación de corriente en aire. Las partículas en la corriente de muestra (69) atraviesan el orificio de la boquilla (70) para formar un chorro (72) a través del cual el haz de láser (71) pasa partículas iluminadoras en la estación de detección (73) para generar múltiples señales que se procesan para generar un punto de datos multiparamétricos. En función de los valores de las múltiples señales, antes de que las gotitas (74) salgan del chorro (72), estas se cargan positivamente, se cargan negativamente, o se dejan neutras. Las gotitas (74) pasan entre unas placas deflectoras cargadas (76), que dirigen las gotitas cargadas (78) a sus recipientes de recopilación (80) respectivos. En un esquema de recopilación, el sistema de flujo identifica todas las partículas de interés a medida que pasan por la estación de detección (73) en función de los valores de sus señales, y luego provoca que el chorro (72) se cargue o se mantenga neutral en el instante en el que la partícula de interés sale del chorro (72) como un gotita, de modo que todas las partículas de interés que tengan

la misma carga se recopilen en el mismo recipiente de recopilación. Ocasionalmente, múltiples partículas pasan por la estación de detección (73) en estrecha proximidad, de modo que sus señales no sean distinguibles por el sistema de flujo. Tales eventos coincidentes son indeseables y habitualmente conducen al rechazo de la gotita que contiene tales partículas (p. ej., 77). La tasa de tales eventos coincidentes, así como sus cambios, son características útiles para supervisar en relación con la presente invención. La tasa de eventos coincidentes es proporcional a la concentración de partículas en el fluido de muestra. Un cambio en la tasa de eventos coincidentes es una indicación de que las partículas pueden estar sedimentando en el fluido de muestra o que las partículas se están aglutinando o agregando de otro modo en el fluido de muestra. Los cambios en la tasa coincidente pueden ser registrados por el sistema de flujo por un mayor número de puntos de datos que caen dentro de un subconjunto predeterminado que se selecciona para abarcar los valores de señal anticipados (denominados "valores de señal coincidentes" en esta memoria) de dos partículas en una única gotita. Como se ha mencionado anteriormente, una gran variedad de sistemas de fluídica, celdas de flujo, sistemas de detección, y sistemas de purgado se pueden emplear con los sistemas de flujo de la invención. Estos elementos de los sistemas de flujo de la invención son bien conocidos en la técnica y se describen en las siguientes referencias: 3.826.364; 3.710.933; 7.012.689; 5.464.581; 4.988.619; y similares.

Las acciones correctivas frecuentemente incluyen una etapa de purgar el sistema de fluídica del sistema de flujo. Los detalles de un sistema de flujo de purgado en particular pueden variar ampliamente, pero, en general, el purgado incluye cambiar la dirección del flujo de fluidos o reactivos en el sistema de fluídica para eliminar la materia extraña, tales como residuos celulares, que pueden estar afectando a las funciones del sistema. En un aspecto, para los sistemas de flujo como se muestra en el diagrama de la Figura 1J o 1K, el purgado incluye aumentar el volumen del flujo del fluido envolvente hacia el interior de la cubeta (155) con respecto al del fluido de muestra, de modo que la dirección del flujo a través del tubo de muestra (152) se invierta y el fluido envolvente se desplace desde la entrada (170) a través del tubo de muestra (152) en la dirección de la válvula (182). La duración y la frecuencia de repetición de tales acciones son cuestiones de elección de diseño y se pueden adaptar a muestras particulares, por ejemplo, que pueden ser propensas a aglutinarse o agregarse. En otro aspecto, para los sistemas de flujo tal como el ilustrado en la Figura 1J, puede estar disponible una capacidad para conducir aire o gas hacia el interior de un puerto de la cubeta (155), de modo que la interfase fluido-gas y la posible formación de burbujas sirva para limpiar el interior de la cubeta (155). El flujo normal se reanuda después de eliminar el aire o el gas, posiblemente con la ayuda de reactivos adicionales, p. ej., alcohol. En otro aspecto más, el purgado puede incluir la introducción de reactivos de limpieza especiales en el sistema de fluídica para eliminar los residuos no deseados, p. ej., como enseñan Gross *et al*, patente de los Estados Unidos 5.076.472.

Tales reactivos de limpieza incluyen soluciones oxidantes fuertes, p. ej., una mezcla de NaOH y NaOCl, o una mezcla de KOH y KOCl; y ácidos débiles, p. ej., ácido acético 0,01 M o ácido N-tricloroacético 0,1 M. Como se emplea en esta memoria, una etapa de purgado puede incluir cualquiera de los procedimientos anteriores, ya sea solo o en combinación.

II. Análisis de recopilaciones de puntos de datos multiparamétricos.

Se puede supervisar una amplia variedad de características de puntos de datos multiparamétricos para detectar cambios en el rendimiento del sistema de flujo que deberían desencadenar acciones correctivas. Tales características pueden incluir los números de puntos de datos recopilados en regiones predeterminadas o conjuntos de espacio de datos, o proporciones de tales números entre una pluralidad de tales regiones predeterminadas. En un aspecto, tales regiones predeterminadas son las celdas (o un subconjunto de dichas celdas) de una cuadrícula que cubre el espacio de datos pertinente. En otro aspecto, tales características pueden ser parámetros asociados con agrupaciones de puntos de datos, p. ej., centro de gravedad, parámetros de una aproximación gaussiana, y similares. Existen muchas referencias disponibles para guiar en la selección y la aplicación de diferentes características de puntos de datos multiparamétricos para análisis de conformidad con la presente invención, incluyendo las siguientes referencias a modo de ejemplo: Boddy *et al*, Cytometry, 44: 195-209 (2001); Shapiro, Practical Flow Cytometry, 4.^a edición; y similares. En otra realización a modo de ejemplo, se pueden agregar partículas específicas a las muestras de célula, con características bien definidas tales como la concentración, la dispersión de luz y la fluorescencia. Tales partículas se pueden definir con precisión en el espacio de datos y los cambios en sus características se pueden utilizar como detectores muy sensibles de cambios de fluidos y, de este modo, se pueden utilizar para desencadenar acciones correctivas de la invención.

A. Compuertas para definir subconjuntos de partículas.

Un elemento importante de un sistema de flujo de la invención es la definición y el uso de compuertas para definir subconjuntos de partículas que se analizan y/o clasifican. A medida que una partícula pasa por una estación de detección de un sistema de flujo, se genera una pluralidad de señales, p. ej., dispersión de luz frontal, dispersión de luz lateral, emisiones desde diversos marcadores fluorescentes, y similares. Cada una de estas señales se convierte en un valor numérico para formar un punto de datos multiparamétricos para la partícula. El punto de datos multiparamétricos puede incluir el tiempo en el que la partícula entra o pasa por algún otro punto de referencia en la estación de detección. Las compuertas son regiones dentro del espacio multidimensional que contienen los puntos de datos multiparamétricos. Habitualmente, las compuertas correspondientes a subconjuntos de partículas de interés, tales como los linfocitos CD4+ en una muestra de sangre, son definidos por los usuarios con la ayuda de un *software*

asociado funcionalmente con el sistema de flujo. Las compuertas, a su vez, proporcionan al usuario un método conveniente para seleccionar subconjuntos de partículas para recuento, aislamiento, u otra manipulación. Habitualmente, el procesamiento de señales en un sistema de flujo incluye varios tipos de compuertas. La denominada compuerta de "umbral" se realiza habitualmente en únicamente un parámetro óptico, tal como la dispersión de luz frontal, y define una región abierta dentro del espacio de datos multidimensionales. A menudo, se emplea para eliminar señales de bajo nivel de alta frecuencia provocadas por artículos, tales como residuos en la muestra, que abrumarían la capacidad de procesamiento de la electrónica del sistema de detección que está diseñada para procesar señales generadas por partículas de interés. Las compuertas de "ventana" definen, a menudo, regiones cerradas en el espacio de datos multidimensionales, p. ej., definiendo unos límites superior e inferior para los valores de señal, y, a menudo, corresponden a tipos de partículas o de células que se van a contar, clasificar, excluir, etc. Las compuertas de ventana (también denominadas sencillamente "compuertas" en esta memoria) se pueden implementar en tiempo real, es decir, un sistema de flujo tomará una acción sobre la partícula cuyas señales correspondan a un punto de datos multiparamétricos dentro de la compuerta, o una compuerta de este tipo se puede implementar fuera de línea, es decir, después de que se haya registrado un punto de datos multiparamétricos en un dispositivo de almacenamiento de datos, p. ej., mucho después de que la partícula correspondiente haya abandonado el sistema de flujo. El uso de compuertas de umbral y de ventana es una parte integral de una aplicación clasificadora de partículas o células. En un aspecto, el objetivo de un clasificador de este tipo es aislar un tipo de partícula o de célula en particular. Se necesitan compuertas de umbral y de ventana para identificar las partículas o células que se desean clasificar y las que no se desean clasificar. Estas compuertas deben ser compuertas en tiempo real porque las decisiones de clasificación se deben tomar durante el tiempo que la partícula o célula está en tránsito entre el punto de detección y el punto de decisión de clasificación, p. ej., el punto de desprendimiento de gotitas en un clasificador de corriente en aire. Cada partícula o célula se debe procesar completamente antes de que se pueda procesar la siguiente partícula o célula, por lo que el tiempo permitido para el procesamiento es en realidad más corto que el tiempo de tránsito. En los casos en los que una segunda o una tercera partícula o célula llega demasiado pronto, p. ej., debido a una concentración demasiado alta de células en una muestra, o debido a la aglutinación de células o partículas, a menudo se marca como desconocida y se considera un evento coincidente no deseado.

De particular interés en la presente invención son las compuertas definidas con respecto a otras compuertas, denominadas compuertas "atadas" en esta memoria, p. ej., como se describe en el BD FACSDiva Software 6.0 Reference Manual (BD Biosciences, San José, California, 2007). Es decir, una primera compuerta (denominada compuerta de "anclaje") puede ser definida por un usuario en una variedad de maneras, por ejemplo, definiendo manualmente un polígono que encierra una agrupación de puntos de datos en una gráfica bidimensional. También se puede definir una segunda compuerta, p. ej., un segundo polígono, que encierra una población de puntos de datos separados de aquellos encerrados por el primer polígono y que corresponde a una población de partículas que es poco común en comparación con las partículas encerradas por el primer polígono. Por ejemplo, las partículas poco comunes pueden ser células poco comunes que poseen un receptor único sobre sus superficies, p. ej., receptores CD34 de células madre, de modo que los puntos de datos multiparamétricos correspondientes puedan tener una componente cuyo valor siempre sea distinto de cero, mientras que las partículas de la compuerta de anclaje pueden tener todas un valor de cero para la misma componente. La compuerta atada tiene una posición en el espacio de datos que es relativa a la posición de la compuerta de anclaje, de modo que, si se mueve la compuerta de anclaje, la compuerta atada también se mueve y mantiene su posición relativa a la compuerta de anclaje. En un ejemplo, una población poco común de células ("una segunda subpoblación de células") definida con una compuerta atada se puede aislar mediante clasificación en una operación de clasificación de larga duración, donde el comportamiento aberrante de un sistema de flujo puede ser detectado por cambios en los puntos de datos multiparamétricos en la compuerta de anclaje (donde los puntos de datos en la compuerta de anclaje corresponden a "una primera subpoblación de células"). Dado que se produce una frecuencia más alta de puntos de datos multiparamétricos dentro de la compuerta de anclaje, existe una mayor probabilidad de que los cambios estadísticamente significativos en la población se detecten antes, dando, de este modo, una alerta temprana de posibles pérdidas de clasificación o contaminación de las células poco comunes de la compuerta atada. Preferiblemente, los términos "células poco comunes" o "subpoblación de células poco comunes" significan una subpoblación de células en una muestra que constituyen menos del 20 por ciento de la población total de células; y, más preferiblemente, constituyen menos del 10 por ciento de la población total de células; y, aún más preferiblemente, constituyen menos del 5 por ciento de la población total; y, aún más preferiblemente, constituyen menos del 2 por ciento de la población total.

B. Esquemas para identificar agrupaciones y para establecer y ajustar compuertas.

Muy frecuentemente, las partículas de interés corresponden a agrupaciones, o grupos, discernibles, de puntos de datos multiparamétricos en un espacio de datos multidimensionales, de modo que se han desarrollado muchas técnicas para identificar agrupaciones en datos multiparamétricos, para determinar diferencias entre agrupaciones y para establecer compuertas correspondientes a una agrupación. En las siguientes referencias se describen ejemplos representativos de tales técnicas: Bierre *et al*, patente de los Estados Unidos 5.627.040; Lock, patente de los Estados Unidos 6.014.904; Bierre *et al*, patente de los Estados Unidos 5.795.727; Roederer *et al*, patente de los Estados Unidos 6.178.382; Murphy, *Cytometry* 6: 302-309 (1985); Loken *et al*, *Cytometry*, 11: 453-459 (1990); Fu *et al*, *Pattern Recognition*, 26: 365-373 (1993); Frankel *et al*, *Cytometry*, 23: 290-302 (1996); Barlage *al*, *Analytical Cellular Pathology*, 19: 81-90 (1999); Verwer *et al*, *Cytometry*, 14: 862-875 (1993); Wilkins *et al*, *Cytometry*, 44: 210-217 (2001); Boddy *et al*, *Cytometry*, 44: 195-209 (2001); Boedigheimer *et al*, *Cytometry*, 73: 421-429 (2008); Lo *et al*, *Cytometry*,

73: 321-332 (2008); y similares. Como se ha mencionado anteriormente, los perfiles de datos pueden incluir compuertas asociadas con, o basadas en, agrupaciones de puntos de datos que corresponden a una o más subpoblaciones de partículas en una muestra (denominadas "compuertas de agrupación" en esta memoria). Tales compuertas se establecen fácilmente mediante el *software* de instrumentos disponible en la mayoría de los citómetros de flujo comerciales, p. ej., el *software* FACSDiva (citado anteriormente). Habitualmente, tal *software* permite la selección de formas de compuerta estándar, p. ej., elipsoide, y volúmenes, y también ofrecen diversas opciones para dimensionar o colocar la compuerta, p. ej., si abarca un porcentaje de los puntos de datos totales en una agrupación seleccionada, si está colocado con respecto al "centro de gravedad" de los puntos de datos de agrupación, o similares. Preferiblemente, las compuertas de agrupación se colocan con respecto al centro de gravedad de los puntos de datos. En una realización, las compuertas de agrupación son de forma elipsoide o poligonal. Algún *software*, p. ej., la función de compuerta "snap-to" en Divo, tiene, además, la capacidad de analizar fuera de línea conjuntos de puntos de datos recopilados previamente, donde las agrupaciones en los diferentes conjuntos se pueden identificar y comparar volviendo a colocar una compuerta de agrupación originalmente especificada. Tal *software* se puede utilizar en relación con la invención, donde, en lugar de uso fuera de línea, la capacidad de volverse a colocar se utiliza en tiempo real para tomar decisiones de clasificación y enumeración en condiciones donde una agrupación de interés "se mueve" durante el funcionamiento de un sistema de flujo debido al funcionamiento aberrante del sistema, p. ej., obstrucciones en la fluídica, etc.

III. Acciones correctivas.

Como se ha descrito anteriormente, los cambios en el patrón de datos recopilados detectados de conformidad con la invención pueden desencadenar la ejecución de acciones correctivas para evitar la acumulación de datos fallidos o la pérdida o contaminación de células poco comunes, es decir, puntos de datos multiparamétricos recopilados en condiciones donde los sistemas de iluminación o de fluidos no funcionan correctamente. La mayoría de las circunstancias que dan lugar a un mal funcionamiento en la recopilación de datos se incluyen en una o más de las siguientes clases amplias: (a) agrupamiento o agregación de células en una muestra, p. ej., sedimentándose en el fondo de un recipiente de muestra, (b) degradación de las células en una muestra, p. ej., desintegrándose por choque osmótico, o similar, (c) cambios inesperados en los parámetros de funcionamiento físicos, p. ej., la temperatura, el grado de vibración, (d) degradación química de los marcadores, p. ej., porciones de unión que se degradan o tintes que se decoloran, y (e) obstrucciones en el sistema de fluídica. Se pueden programar muchos escenarios en un sistema de flujo para tomar acciones correctivas automáticas en función de análisis de los patrones de puntos de datos multiparamétricos recopilados durante intervalos de tiempo sucesivos. La siguiente tabla proporciona escenarios a modo de ejemplo; sin embargo, un experto en la técnica reconoce que tales ejemplos no son exhaustivos y que son posibles escenarios adicionales, particularmente para aplicaciones especializadas, p. ej., clasificar y/o analizar células o partículas con formas especiales, p. ej., espermatozoides, clasificar y/o analizar agrupaciones de células, y similares.

Aberrancia detectada	Posible causa	Acciones correctivas
<ul style="list-style-type: none"> • Los valores de las mismas componentes de todos los puntos de datos multiparamétricos disminuyen. • Otros valores y tasa de eventos normales; eventos de alta frecuencia y de baja señal normales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación/decoloración del marcador celular y pérdida de las células o pérdida de intensidad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anotar datos. • Si es gradual, continuar con la enumeración/clasificación mediante el ajuste de las compuertas para rastrear las subpoblaciones de células deseadas. • De manera alternativa, o junto con lo anterior, aumentar la ganancia de PMT para el canal. • Si > valor predeterminado, detener la enumeración/clasificación; notificar al operario.

Aberrancia detectada	Posible causa	Acciones correctivas
<ul style="list-style-type: none"> • Los valores de las mismas componentes de todos los puntos de datos multiparamétricos disminuyen. • Los valores de las señales adyacentes espectralmente aumentan; tasa de eventos normal; eventos de alta frecuencia y de baja señal normales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación/decoloración del marcador celular y cambio de características espectrales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anotar datos. • Si es gradual, continuar con la enumeración/clasificación mediante el ajuste de las compuertas para rastrear las subpoblaciones de células deseadas. • De manera alternativa, o junto con lo anterior, recalcular e implementar parámetros de compensación. • Si > valor predeterminado, detener la enumeración/clasificación; notificar al operario.
<ul style="list-style-type: none"> • Los puntos de datos multiparamétricos recopilados en una compuerta de agrupación disminuyen. • Tasa de eventos de partículas grandes normal; eventos de alta frecuencia y de baja señal aumentan. 	<ul style="list-style-type: none"> • Células en la muestra se degradan. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anotar datos. • Si es gradual, continuar con la enumeración/clasificación mediante el ajuste de las compuertas para rastrear las subpoblaciones de células deseadas. • Si > límite predeterminado, detener la enumeración/clasificación; notificar al operario.
<ul style="list-style-type: none"> • Los puntos de datos multiparamétricos recopilados en una compuerta de agrupación disminuyen. • Tasa de coincidencia más alta; eventos de alta frecuencia y de baja señal normales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Células en sedimentación o agregación de muestras. 	<ul style="list-style-type: none"> • Revolver o agitar la muestra.
<ul style="list-style-type: none"> • Los puntos de datos multiparamétricos recopilados en la primera celda de cuadrícula disminuyen y los puntos de datos recopilados en la segunda celda de cuadrícula adyacente aumentan simultáneamente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Residuos en el sistema de fluídica que desvían la corriente de muestra fuera de la estación de detección. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anotar datos o suspender la recopilación/clasificación de datos. • Purgar/limpiar el sistema de fluídica. • Reiniciar la recopilación/clasificación de datos. • Si la aberración persiste, detener la enumeración/clasificación; notificar al operario.
<ul style="list-style-type: none"> • Los puntos de datos multiparamétricos recopilados en la primera celda de cuadrícula disminuyen y los puntos de datos recopilados en la segunda celda de cuadrícula adyacente permanecen inalterados. • Tasa de coincidencia más alta; eventos de alta frecuencia y de baja señal normales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Células en sedimentación o agregación de muestras. 	<ul style="list-style-type: none"> • Revolver o agitar la muestra.

Aberrancia detectada	Posible causa	Acciones correctivas
<ul style="list-style-type: none"> • El selector de muestras selecciona una nueva muestra; no hay puntos de datos multiparamétricos recopilados en la compuerta de agrupación; puntos de datos recopilados en una o más celdas de cuadrícula a tasas mayores a las esperadas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra defectuosa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Seleccionar la siguiente muestra.
<ul style="list-style-type: none"> • Todas las señales disminuyen de valor. • Tasa de eventos normal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Residuos en el sistema de fluídica que desvían la corriente de muestra fuera de la estación de detección. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anotar datos o suspender la recopilación/clasificación de datos. • Purgar/limpiar el sistema de fluídica. • Reiniciar la recopilación/clasificación de datos. • Si la aberración persiste, detener la enumeración/clasificación; notificar al operario.
<ul style="list-style-type: none"> • Todas las señales disminuyen de valor. • Tasa de eventos de partículas grandes más baja. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bloqueo en el sistema de fluídica que inhibe preferentemente el paso de partículas grandes; corriente de muestra desviada fuera de la estación de detección. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anotar datos o suspender la recopilación/clasificación de datos. • Purgar/limpiar el sistema de fluídica. • Reiniciar la recopilación/clasificación de datos. • Si la aberración persiste, detener la enumeración/clasificación; notificar al operario.

Estas y otras acciones correctivas se pueden realizar en un método a modo de ejemplo, particularmente para clasificar subpoblaciones de células poco comunes, que comprende las siguientes etapas: (a) proporcionar una columna de fluido en movimiento dentro de la cual las partículas de una muestra se mueven a lo largo de una trayectoria común de muestra; (b) recopilar una pluralidad de señales de cada partícula a medida que pasa por una o más estaciones de detección a lo largo de la trayectoria común de muestra, asignándosele a cada señal de la pluralidad un valor de señal para formar un punto de datos multiparamétricos para cada partícula, enumerando el sistema de detección tales puntos de datos multiparamétricos en una pluralidad de subconjuntos predeterminados durante intervalos de tiempo sucesivos para formar un perfil de datos que tiene una característica de perfil de datos para cada uno de tales intervalos de tiempo; y (c) activar una o más acciones correctivas, tales como las descritas anteriormente, siempre que la característica de perfil de datos de un intervalo de tiempo exceda un límite predeterminado. De particular interés son las realizaciones del método anterior, donde la pluralidad de subconjuntos predeterminados incluye una compuerta de agrupación, donde la compuerta de agrupación tiene una posición que abarca una agrupación de dichos puntos de datos multiparamétricos correspondientes a una subpoblación de células de interés en una muestra. En un aspecto, se puede seleccionar una característica de perfil de datos que es el número de puntos de datos multiparamétricos enumerados en la compuerta de agrupación, de modo que una acción correctiva puede ser etapas repetidas de mover la posición de la compuerta de agrupación a una nueva posición para rastrear continuamente la posición de la agrupación de interés. Más particularmente, siempre que la característica de perfil de datos actual (es decir, el número de puntos de datos multiparamétricos enumerados en un intervalo de tiempo actual) sea menor que el número correspondiente en un intervalo de tiempo anterior en más de un porcentaje predeterminado, el sistema de control del sistema de flujo calcula una nueva posición para la compuerta de agrupación, de modo que, en la nueva posición, la compuerta de agrupación abarca de nuevo la agrupación. Tales métodos son particularmente útiles para operaciones de clasificación de larga duración, donde las células de una agrupación seleccionada se pueden clasificar con éxito con la asistencia de un operario, aunque a través de cambios de instrumentos, una agrupación se mueve o migra dentro de un espacio de datos. Los cambios porcentuales predeterminados a modo de ejemplo para realizar tal ajuste de compuerta incluyen el 10 por ciento, el 5 por ciento, o el 2 por ciento. Como se ha mencionado anteriormente, el método se puede emplear para la clasificación desatendida de subpoblaciones de células poco comunes utilizando una compuerta de agrupación como compuerta de anclaje con una compuerta atada que abarca la subpoblación de

células poco comunes de interés.

Ejemplo

Sistema para supervisar puntos de datos multiparamétricos generados por un citómetro de flujo FACSCalibur

5 Un FACSCalibur (BD Biosciences, San José, California) con un cargador de muestra de alto rendimiento (HTS, por las siglas en inglés de *High Throughput Sample*) (BD Biosciences, San José, California) se utilizó para analizar 48 muestras de monocitos de sangre periférica (PBMC, por las siglas en inglés de *Peripheral Blood Mononuclear Cell* [célula mononuclear de sangre periférica]) estimuladas con un amplio conjunto de reactivos, incluyendo cócteles antigénicos de péptidos, superantígenos y mitógenos policlonales, luego teñidas con dos cócteles de cuatro colores para explorar la frecuencia y los patrones inmunofenotípicos de las células T que responden, como se describe en Inokuma *et al*, J. Immunol., 179: 2627-2633 (2007). Las muestras se adquirieron sin supervisión manual constante y la recopilación de datos estuvo sujeta a una variedad de fallas relacionadas con fluidos y/o muestras. El *software* se creó para supervisar la recopilación de puntos de datos multiparamétricos mediante la comparación de cambios en la tasa de eventos (es decir, la tasa de recopilación de puntos de datos multiparamétricos) o cambios en la distribución de los puntos de datos multiparamétricos recopilados dentro de las celdas de una cuadrícula que cubre todo el espacio de valores de señal medidos (es decir, espacio de datos). El *software* proporcionó una interfaz de usuario para definir conjuntos predeterminados de puntos de datos multiparamétricos, intervalos de recopilación o muestreo, y otros parámetros, tal como el tiempo de iniciar el proceso de supervisión. En las Figuras 2A y 2B, se muestran dos capturas de pantalla de la interfaz de usuario. En la Figura 2A, la pantalla (200) que comprende una interfaz de usuario se compone de dos visualizaciones gráficas de datos (202) y (204), un panel o cuadro de diálogo (220) para que un usuario ingrese valores que definen intervalos de parámetros para desencadenar acciones correctivas de conformidad con una realización particular, un panel (216) para enumerar archivos de datos, y un panel (218) para enumerar el estado y el historial de recopilación de datos. Por ejemplo, los tiempos se anotan cuando el patrón de puntos de datos recopilados cambia, los tiempos y tipos de acciones correctivas se anotan, los puntos de datos multiparamétricos se anotan, los cuales se han indicado como recopilados bajo condiciones de fluidica aberrantes, y similares. La visualización de datos (202) es un gráfico de un único parámetro de los puntos de datos multiparamétricos frente al tiempo, que da una medida visual de la tasa de eventos de detección de partículas. (En este caso, el único parámetro es la intensidad de fluorescencia de las células marcadas con un anticuerpo anti-CD69 marcado con ficoeritrina, o "CD69 PE"). Una reducción repentina en la tasa de eventos, tal como se muestra mediante (206), puede indicar la presencia de una obstrucción en la línea o tubo de muestra, lo cual requeriría una acción correctiva. La visualización de datos (204) es una gráfica bidimensional que muestra tres agrupaciones primarias de puntos de datos multiparamétricos (208), (212) y (214), que se distribuyen entre las celdas de la cuadrícula (210). Los cambios en los números relativos de puntos de datos en las celdas de la cuadrícula (210) (es decir, el perfil de datos del sistema) proporcionan otra medida, además de los cambios en la tasa de eventos, del estado de las alineaciones ópticas y de fluidos del sistema de flujo. La interfaz de usuario (200) permite, además, que un usuario ingrese valores en el cuadro (222) para definir la longitud de los intervalos de recopilación para realizar comparaciones de patrones de datos para detectar cambios. Los cuadros (224) y (226) proporcionan valores para el tiempo para comenzar a supervisar y valores para calcular la tasa de eventos promedio en un intervalo, respectivamente.

La Figura 2B muestra una pantalla (227) que es sustancialmente la misma que la de la Figura 2A, excepto que el panel o cuadro de diálogo (228) se selecciona visualizando cuadros para que un usuario ingrese valores para definir cambios en la distribución de los puntos de datos dentro de las celdas de la cuadrícula (210) que deberían desencadenar una acción correctiva. En la Figura 2B, la visualización de datos (204) muestra los datos recopilados en el intervalo (230), mostrado en la visualización de datos (202). Claramente, en esta visualización de datos, la densidad de puntos de datos multiparamétricos en todas las tres agrupaciones (232), (234) y (236) es mucho menor que la que se muestra en la misma visualización de la Figura 2A. Tales cambios pueden ser uniformes en todas las tres agrupaciones, o pueden afectar predominantemente únicamente a un subconjunto de agrupaciones. En cualquier caso, estos cambios se pueden utilizar para desencadenar acciones correctivas.

La interfaz de usuario a modo de ejemplo de las Figuras 2A y 2B, así como el *software* asociado para controlar los sistemas de instrumentos, está programado utilizando lenguajes y técnicas convencionales, bien conocidas por los expertos en la técnica.

50 En un ejemplo que utiliza la realización anterior de la invención, se utilizaron los siguientes ajustes (Tabla I):

Tabla I

Ajustes		Gráficos
Intervalo de muestreo	1	Tiempo frente a FL4
Ignorar los primeros x segundos	0	FL4 frente a FL3 (CD3 frente a CD4)
Núm. de puntos para media	6	

Tasa de eventos		Cuadrícula de datos	
		Resolución de bandeja de cuadrícula	3
Tasa de eventos mín.	50	% mín. para verificar la cuadrícula	15
% de desviación de la media	40	% de desviación de la media	40
Utilizar 2 SD como desencadenante	sí	Utilizar 2 SD como desencadenante	sí
1:NS (3)	no	1:NS (3)	no
2:2SD	sí	2:2SD	sí
R:45	sí	R:45	sí
4:1S	sí	4:1S	sí
N:X (10)	sí	N:X (10)	sí
N:T (7)	sí	N:T (7)	sí

5 Esta regla se aplicó a aproximadamente 2000 archivos de datos de flujo, 1850 del gran conjunto de datos de Calibur/HTS disponible en www.FICCS.org, y 80 archivos de rutina adquiridos durante la validación de instrumentos normal para un ensayo de sangre entera lisada en un FACSCanto II cargado en carrusel. La eficiencia de las reglas se determinó inspeccionando visualmente todos los archivos y clasificándolos en "archivos de datos válidos" y "archivos de datos incorrectos", anotando entonces cuál de ellos generó indicadores de error por parte del *software*.
 10 Muchos de los archivos mostraban caudales inconsistentes (véanse, por ejemplo, los datos mostrados en la Figura 2A, que en t=650 (206) muestra una disminución sustancial en la tasa de eventos), que de otra manera no mostró problemas notables en los gráficos de puntos de dispersión o fluorescencia asociados con los cambios en la tasa de eventos. Tales archivos se clasifican como "indicados" ya que las reglas casi siempre detectaron tales cambios, y "datos válidos" (columna 3 a continuación), ya que la propia tasa de eventos no es una medición crítica para estas aplicaciones.

Tabla II

Sin indicación	Indicación	Indicación	Sin indicación		
Datos válidos	Datos incorrectos	Datos válidos	Datos incorrectos	TOTAL	
1574	49	217	10	1850	Total de Calibur/HTS
85,08	2,6	12	0,5		Porcentaje
67		13		80	Canto/Carrusel
1641	49	230	10	1930	Total de todo
85,03	2,5	12	0,5		Porcentaje de todo

15 Para caracterizar mejor los elementos más eficientes de nuestras reglas y métricas, se examinó la distribución de los tipos de errores detectados en los archivos indicados inspeccionados manualmente. Los archivos se clasificaron en archivos claramente defectuosos con datos de dispersión y/o fluorescencia comprometidos, archivos indicados con fallas en la tasa de eventos pero datos de fluorescencia no comprometidos, y archivos indicados sin fallas obvias en

los datos. Se muestran los porcentajes de cada clase de los archivos, los cuales dieron el error pertinente (destacándose que algunos archivos generaron varios errores). La primera clase de archivo se describió como "detección de errores verdaderos", las clases intermedia y tercera como "detección de errores falsos".

Tabla III

	Datos incorrectos indicados		Brecha de datos obvios indicados pero datos utilizables		Falla de datos no obvia indicada	
	Errores de tasa	Errores de datos	Errores de tasa	Errores de datos	Errores de tasa	Errores de datos
Menos que n Celdas/Mín	55,10		15,56		3,94	
2:2SD	20,41	20,41	12,2	35,56	14,96	1,57
R:4S	2,04	4,08	0	1,11	8,66	0,04
4:1X	0	0	0	0	0	0
N:X (10)	0	0	0	0	0	0
N:T (7)	0	0	20	2,22	29,13	6,30
Errores totales	1746	1543	417	662	141	60
Errores/Archivo	35,63	31,49	4,63	7,36	1,11	0,47

5

Definiciones

En general, los términos utilizados en esta memoria que no se han definido específicamente de otro modo tienen significados que corresponden a su uso convencional en los campos relacionados con la invención, incluyendo la química analítica, la bioquímica, la biología molecular, la biología celular, la microscopía, los análisis de imágenes, y similares, tal como se representa en las siguientes disertaciones: Robinson *et al* (Editores) Current Protocols in Cytometry (John Wiley & Sons, 2007); Alberts *et al*, Molecular Biology of the Cell, Cuarta Edición (Garland, 2002); Nelson y Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, Cuarta edición (W.H. Freeman, 2004); Murphy, Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging (Wiley-Liss, 2001); Shapiro, Practical Flow Cytometry, Cuarta Edición (Wiley-Liss, 2003); Owens *et al* (Editores), Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice: Quality Assurance for Quantitative Immunophenotyping (Wiley-Liss, 1994); Ormerod (Editor) Flow Cytometry: A Practical Approach (Oxford University Press, 2000); y similares.

"Sistema de flujo" significa cualquier instrumento o dispositivo (i) que es capaz de restringir las partículas a moverse en una trayectoria colineal en una corriente de fluido mediante, o a través de, una o más estaciones de detección que recopilan datos multiparamétricos relacionados con las partículas y (ii) que es capaz de enumerar o clasificar tales partículas en función de los datos multiparamétricos recopilados. Los sistemas de flujo tienen una amplia variedad de formas y utilizan una amplia variedad de técnicas para lograr tales funciones, tal como lo ejemplifican las siguientes referencias: Shapiro, Practical Flow Cytometry, Cuarta Edición (Wiley-Liss, 2003); Bonner *et al*, Rev. Sci. Instruments, 43: 404 (1972); Huh *et al*, Physiol Meas., 26: R73-98 (2005); Ateya *et al*, Anal. Bioanal. Chem., 391: 1485-1498 (2008); Bohm *et al*, patente de los Estados Unidos 7.157.274; Wang *et al*, patente de los Estados Unidos 7.068.874; y similares. Los sistemas de flujo pueden comprender sistemas de fluidica que tienen componentes en donde se inserta una corriente de fluido de muestra en una corriente de fluido de envoltura de modo que las partículas en el fluido de muestra estén obligadas a moverse en una trayectoria colineal, que puede tener lugar en una cubeta, otra cámara que sirve como estación de detección, o en una boquilla u otra estructura, para crear un chorro de corriente en aire, que se puede entonces manipular eléctricamente. Los sistemas de flujo también incluyen dispositivos de microfluidica que tienen canales de pequeñas dimensiones para restringir las partículas a moverse a lo largo de una trayectoria común. En referencia a un sistema de flujo, "purgar" significa limpiar, o detener y reiniciar, o invertir temporalmente o interrumpir de otro modo un flujo de muestra para eliminar un patrón de flujo aberrante, tal como puede ser provocado por una obstrucción.

"Partículas" significa objetos capaces de estar suspendidos en un fluido y que son capaces de ser detectados en un fluido en función de unas características que son susceptibles preferiblemente de medición óptica o eléctrica, tales como el tamaño, el color, la forma, la fluorescencia, o similares. Las partículas incluyen tanto partículas no vivas, tales como microesferas, perlas, o similares, así como también, células biológicas, incluyendo células de mamíferos, microorganismos, bacterias, componentes celulares que incluyen, pero sin limitación, núcleos, cromosomas, vesículas, mitocondrias, agregados de células biológicas que incluyen encapsulaciones de microesferas o cuerpos embrioides o similares.

40

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de flujo para la adquisición de datos multiparamétricos, la clasificación y la enumeración de partículas, comprendiendo el sistema:

5 un sistema de fluídica configurado para propagar una columna de fluido dentro de la cual las partículas de una muestra se mueven a lo largo de una trayectoria común de muestra (154), en donde la muestra es una muestra de prueba para medición y análisis;

10 un sistema de detección para recopilar una o más señales de cada partícula a medida que pasa por una o más estaciones de detección (73, 156) a lo largo de la trayectoria común de muestra (154), asignándosele a cada señal un valor de señal (10) para formar un punto de datos multiparamétricos para cada partícula, recopilando el sistema de detección durante intervalos de tiempo sucesivos (16) dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) en uno o más subconjuntos predeterminados (114, 116, 118) de un espacio de datos, en donde uno o más subconjuntos predeterminados comprenden uno o más términos dentro del espacio de datos que abarcan dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214), para formar un perfil de datos para cada uno de dichos intervalos de tiempo (16), en donde el perfil de datos corresponde a un número de puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) contados dentro del uno o más términos de cada uno de los uno o más subconjuntos predeterminados (114, 116, 118); y

15 un sistema de control (162) asociado funcionalmente con el sistema de fluídica y el sistema de detección, determinando el sistema de control (162) una característica de perfil de datos del perfil de datos actual y comparando la característica de perfil de datos con la de un perfil de datos anterior predeterminado o con un límite predeterminado,

20 en donde el sistema de control (162) está configurado para activar una acción correctiva en tiempo real siempre que dicha característica de perfil de datos exceda el límite predeterminado o difiera de la característica de perfil de datos del perfil de datos anterior predeterminado.

2. El sistema de flujo de la reivindicación 1, en donde dichas partículas son células biológicas.

25 3. El sistema de flujo de la reivindicación 2, en donde dicho uno o más subconjuntos predeterminados (114, 116, 118) comprenden una compuerta de agrupación, en donde la compuerta de agrupación tiene una posición que abarca una agrupación de dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) correspondientes a una primera subpoblación de células en dicha muestra.

30 4. El sistema de flujo de la reivindicación 3, en donde dicho perfil de datos de dicho uno o más subconjuntos predeterminados (114, 116, 118) incluye un número de dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) correspondientes a dicha primera subpoblación de células enumerada en dicha compuerta de agrupación durante dicho intervalo de tiempo (16).

5. El sistema de flujo de la reivindicación 4, en donde dicha acción correctiva incluye volver a determinar dicha posición de dicha compuerta de agrupación siempre que dicho número de dicho perfil de datos exceda dicho límite predeterminado.

35 6. El sistema de flujo de la reivindicación 5, en donde dicha compuerta de agrupación tiene una compuerta atada que encierra una población de células poco comunes de modo que, siempre que se vuelve a determinar dicha posición de dicha compuerta de agrupación, se vuelve a determinar la posición de la compuerta atada.

7. El sistema de flujo de la reivindicación 6, en donde dichas células poco comunes de dicha compuerta atada están siendo clasificadas.

40 8. El sistema de flujo de la reivindicación 2, en donde dicho uno o más subconjuntos predeterminados (114, 116, 118) comprende una pluralidad de celdas de cuadrícula (210) de una cuadrícula (104) que cubre un espacio de datos que abarca todos de dichos puntos de datos multiparamétricos y en donde dichos datos perfil es un conjunto ordenado de números donde cada número corresponde a puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) enumerados en una de las celdas de cuadrícula (210) de la pluralidad durante dicho intervalo de tiempo (16).

45 9. El sistema de flujo de la reivindicación 8, en donde dicha característica de perfil de datos es una suma de dichos números en dicho conjunto ordenado.

10. El sistema de flujo de la reivindicación 2, en donde dicho sistema de fluídica tiene un tubo de muestra (56, 60, 152) que inserta dicha muestra que contiene dichas células biológicas en dicha columna de fluido como una corriente de muestra (69).

50 11. El sistema de flujo de la reivindicación 10, en donde dicha acción correctiva de dicho sistema de control (162) incluye llevar a cabo uno o más ciclos de:

(a) interrumpir la recopilación de dichas señales mediante dicho sistema de detección;

(b) purgar dicho tubo de muestra (56, 60, 152) mediante dicho sistema de fluídica; y

(c) reanudar la recopilación de dichas señales mediante dicho sistema de detección.

12. El sistema de flujo de la reivindicación 10, en donde dicho tubo de muestra (56, 60, 152) inserta dicha muestra en un flujo envolvente de modo que dicha columna de fluido se forme de tal manera que las partículas de dicha muestra estén restringidas a moverse colinealmente dentro de dicha corriente de muestra (69).

5 13. El sistema de flujo de la reivindicación 12, en donde dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) incluyen un valor (10) para la fluorescencia libre de dicha corriente de muestra (69) y en donde dicho sistema de control (162) activa dicha acción correctiva siempre que la componente de fluorescencia libre de dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) cae por debajo de dicho límite predeterminado.

10 14. El sistema de flujo de la reivindicación 10, que incluye, además, un sistema de selección de muestra para seleccionar dicha muestra de un conjunto que comprende una pluralidad de muestras, en donde cada muestra de la pluralidad está en un recipiente separado.

15 15. El sistema de flujo de la reivindicación 14, en donde dicha acción correctiva de dicho sistema de control (162) incluye (a) descartar dicha muestra y seleccionar otra muestra de un recipiente diferente de dicho conjunto de muestras, o (b) eliminar dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) correspondientes a una muestra actual, obtener otra muestra del recipiente de muestra actual, y analizar dicha otra muestra.

16. El sistema de flujo de la reivindicación 2, en donde dicha acción correctiva de dicho sistema de control (162) incluye anotar dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) recopilados durante un período cuando dicho perfil de datos de característica excede dicho límite predeterminado.

20 17. El sistema de flujo de la reivindicación 1, en donde dicho sistema de fluídica comprende un tubo de muestra (56, 60, 152) para insertar la muestra en dicha columna de fluido como una corriente de muestra (69) dentro de la cual dichas partículas se mueven a lo largo de dicha trayectoria común de muestra (154), conteniendo la corriente de muestra (69) fluorescencia libre; y en donde cada punto de datos multiparamétricos incluye una componente que comprende un valor de señal (10) para la fluorescencia libre en la corriente de muestra (69) adyacente a dicha partícula.

25 18. El sistema de flujo de la reivindicación 17, en donde dicho sistema de control (162) activa dicha acción correctiva siempre que la componente de fluorescencia libre de dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) cae por debajo de dicho límite predeterminado.

19. Un método para la adquisición y clasificación de datos fiables en un sistema de flujo según una de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el método las etapas de:

30 proporcionar una columna de fluido en movimiento dentro de la cual las partículas de una muestra se mueven a lo largo de una trayectoria común de muestra (154), en donde la muestra es una muestra de prueba para medición y análisis;

35 recopilar una pluralidad de señales de cada partícula a medida que pasa por una o más estaciones de detección (73, 156) a lo largo de la trayectoria común de muestra (154), asignándosele a cada señal de la pluralidad un valor de señal (10) para formar un punto de datos multiparamétricos para cada partícula, enumerando el sistema de detección dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) en una pluralidad de subconjuntos predeterminados (114, 116, 118) durante intervalos de tiempo sucesivos (16) para formar un perfil de datos que tiene una característica de perfil de datos para cada uno de dichos intervalos de tiempo (16);

40 activar una o más acciones correctivas siempre que la característica de perfil de datos de un intervalo de tiempo (16) exceda un límite predeterminado.

45 20. El método de la reivindicación 19, en donde dichas partículas son células biológicas y en donde dicha pluralidad de subconjuntos predeterminados (114, 116, 118) es (a) una pluralidad de celdas de cuadrícula (210) de una cuadrícula (104) que cubre un espacio de datos que abarca todos de dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) o un subespacio de este, o (b) al menos una compuerta de agrupación en el espacio de datos o un subespacio de este.

21. El método de la reivindicación 20, en donde dichas células biológicas se introducen en dicha columna de fluido en movimiento mediante un tubo de muestra (56, 60, 152) y en donde dicha etapa de activar una o más acciones correctivas incluye uno o más ciclos que comprenden las etapas de:

interrumpir la recopilación de dichas señales;

50 purgar el tubo de muestra (56, 60, 152); y

reanudar la recopilación de dichas señales.

- 5 22. El método de la reivindicación 20, en donde dicha pluralidad de subconjuntos predeterminados (114, 116, 118) incluye dicha compuerta de agrupación, teniendo dicha compuerta de agrupación una posición que abarca una agrupación de dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214), en donde dicho perfil de datos es un número de puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) enumerados en dicha compuerta de agrupación, y en donde dicha etapa de activar una o más acciones correctivas incluye uno o más ciclos que comprenden la etapa de mover la posición de dicha compuerta de agrupación a una nueva posición siempre que el número de puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) enumerados en un intervalo de tiempo actual (16) sea menor que un número de un intervalo de tiempo anterior (16) en más de un porcentaje predeterminado, de modo que, en la nueva posición, dicha compuerta de agrupación abarca de nuevo la agrupación.
- 10 23. El método de la reivindicación 20, (a) en donde dicha pluralidad de subconjuntos predeterminados (114, 116, 118) incluye dicha compuerta de agrupación, teniendo dicha compuerta de agrupación una posición que abarca una agrupación de dichos puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) y una compuerta atada, abarcando la compuerta atada una subpoblación de células poco comunes, (b) en donde dicha característica de perfil de datos es un número de puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) enumerados en dicha compuerta de agrupación, y
- 15 (c) en donde dicha etapa de activar una o más acciones correctivas incluye uno o más ciclos que comprenden la etapa de mover la posición de dicha compuerta de agrupación a una nueva posición siempre que el número de puntos de datos multiparamétricos (208, 212, 214) enumerados en un intervalo de tiempo actual (16) sea menor que un número en un intervalo de tiempo anterior (16) en más de un porcentaje predeterminado, de modo que, en la nueva posición, dicha compuerta de agrupación abarca de nuevo la agrupación y la compuerta atada abarca de nuevo la población de
- 20 células poco comunes.
24. El método de la reivindicación 19, en donde el punto de datos multiparamétricos comprende un valor de señal para una o más señales de dispersión y un valor de señal para una o más señales fluorescentes.

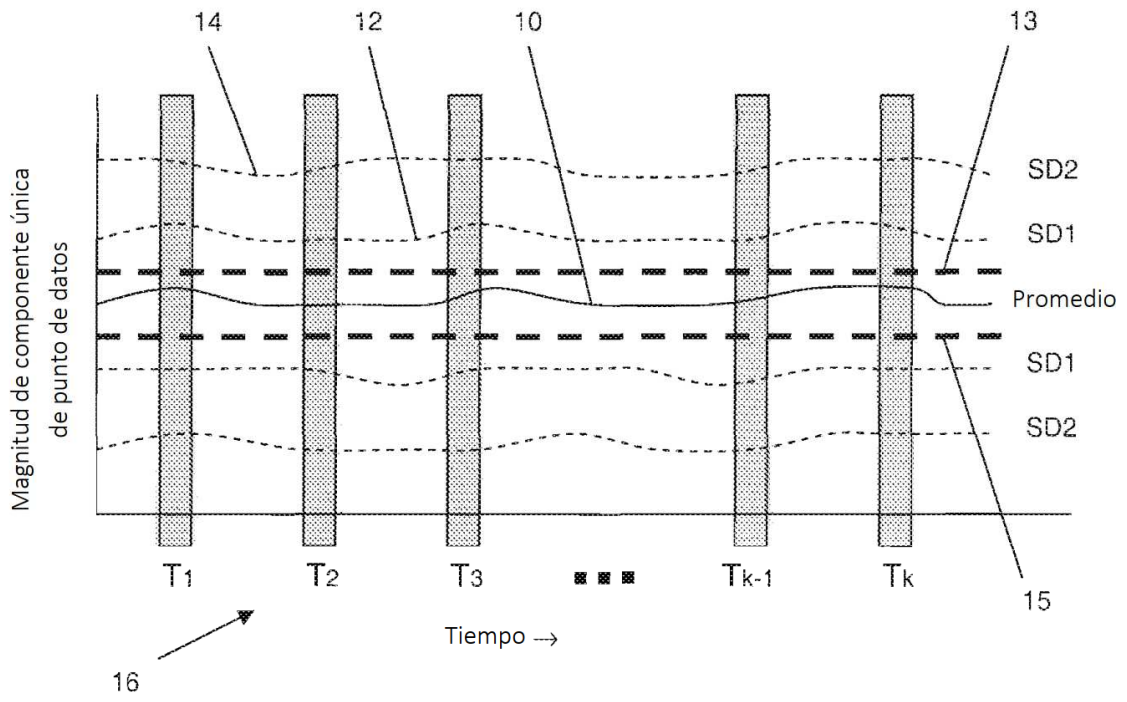


Fig. 1A

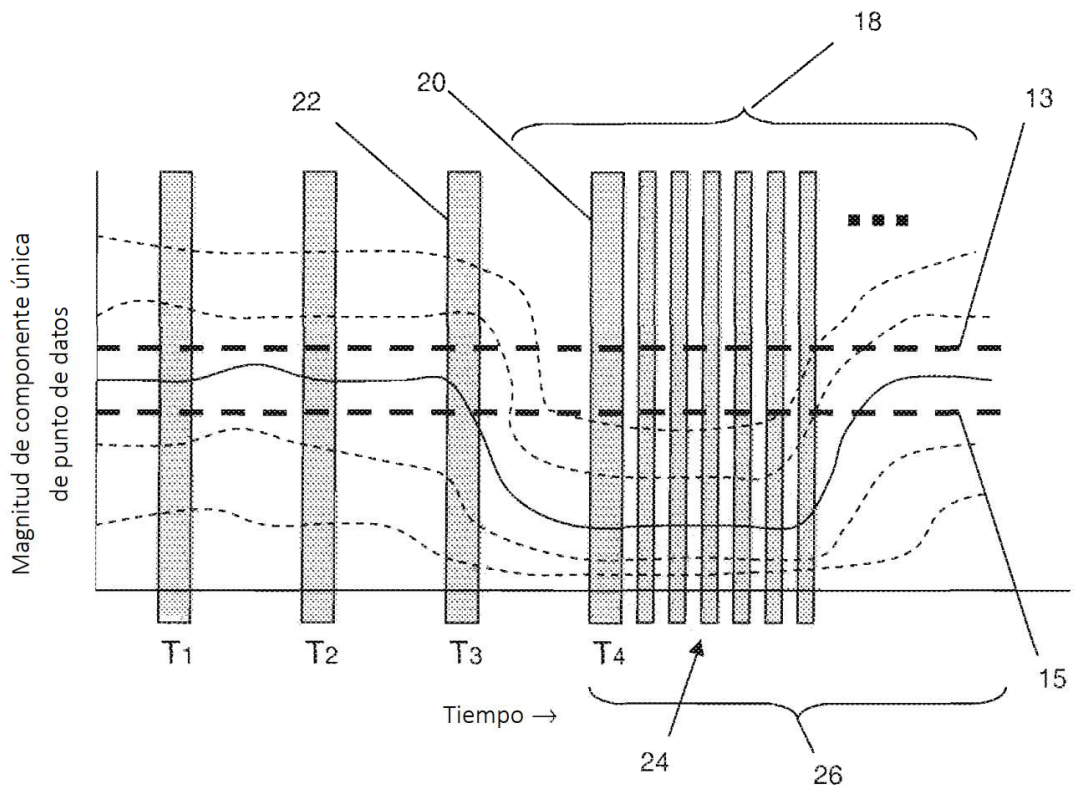


Fig. 1B

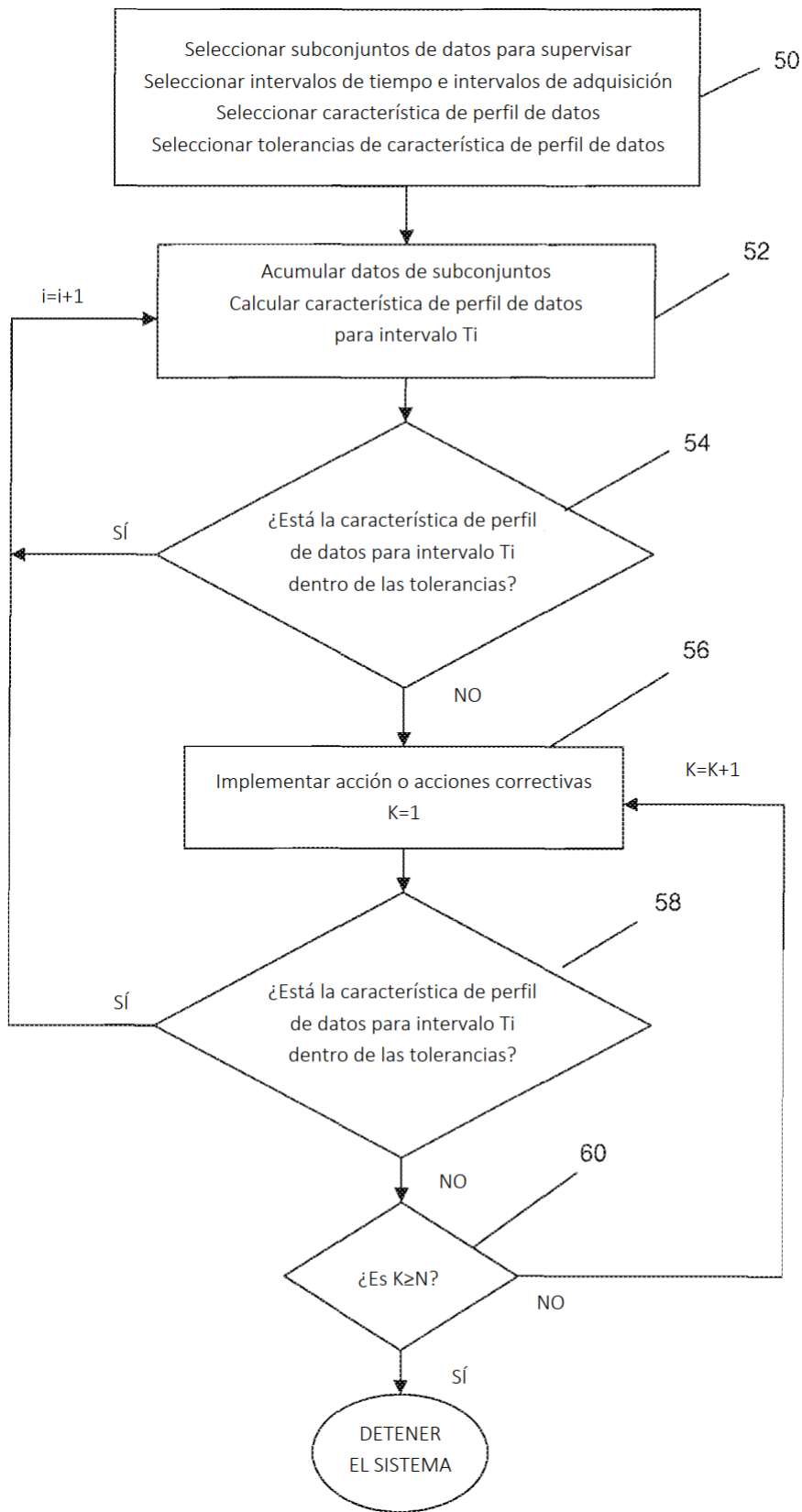


Fig. 1C

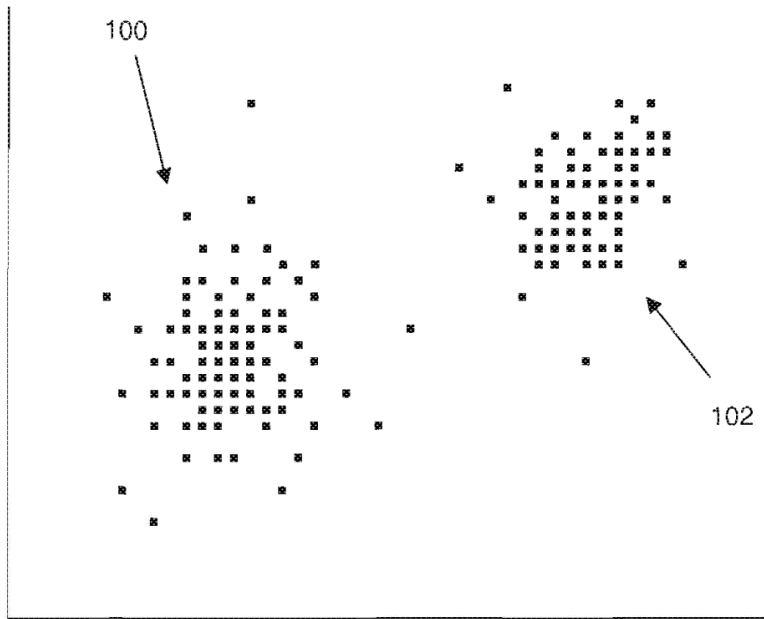


Fig. 1D

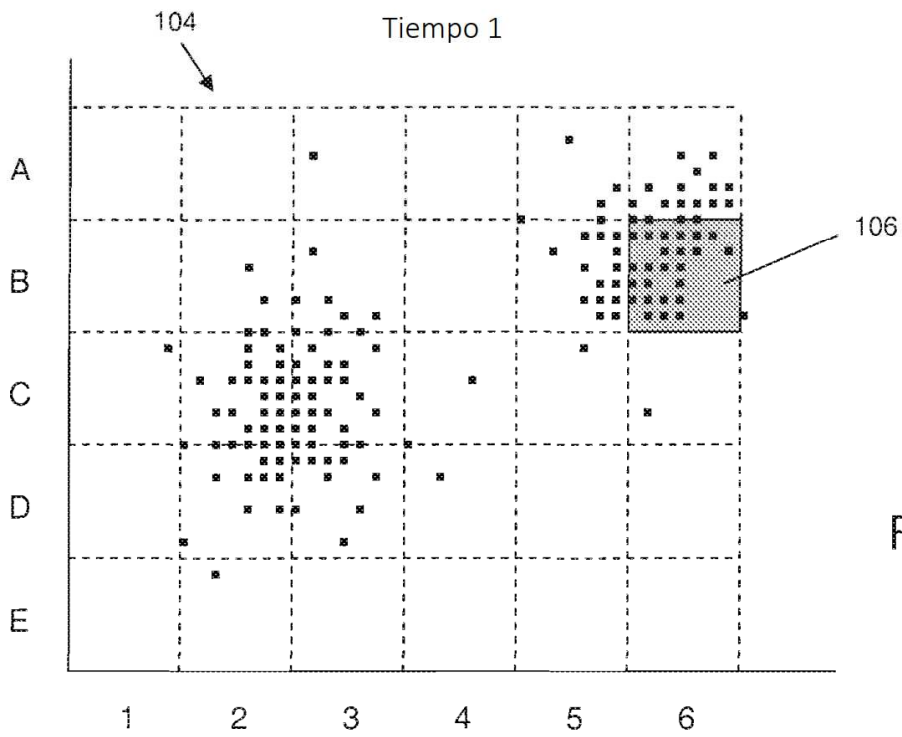


Fig. 1E

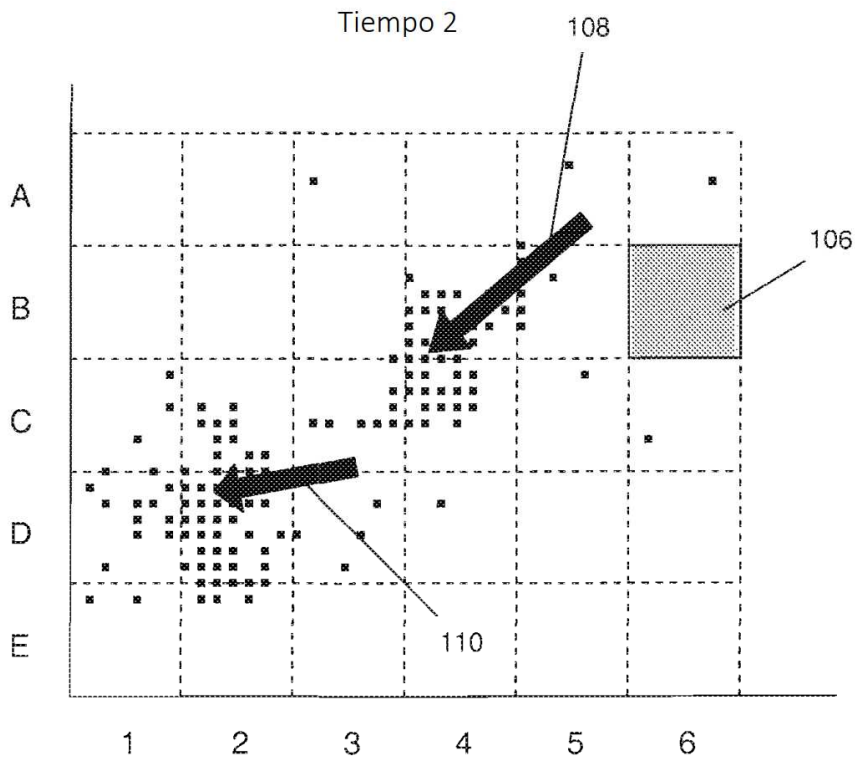


Fig. 1F

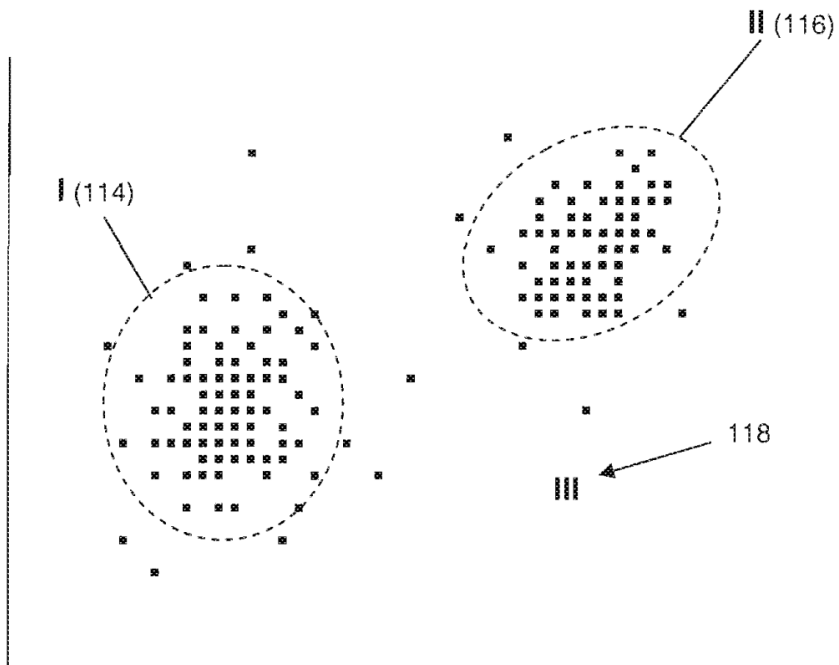


Fig. 1G

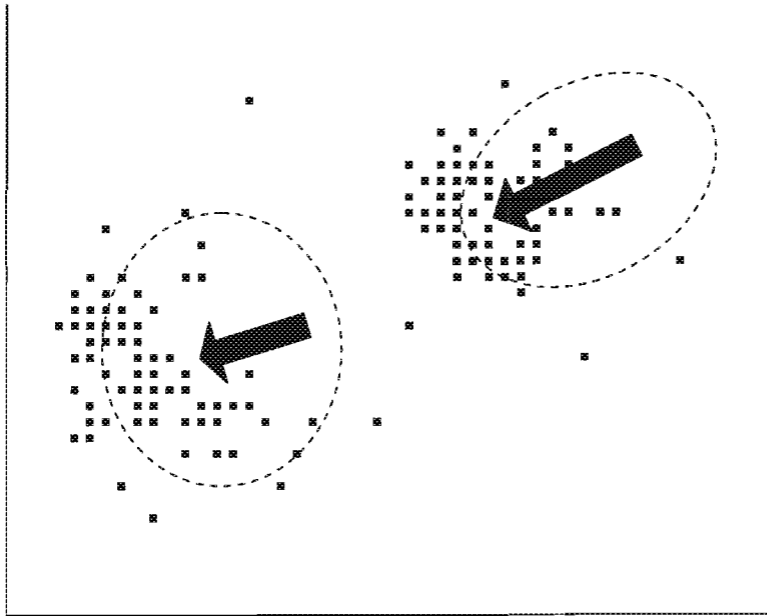


Fig. 1H

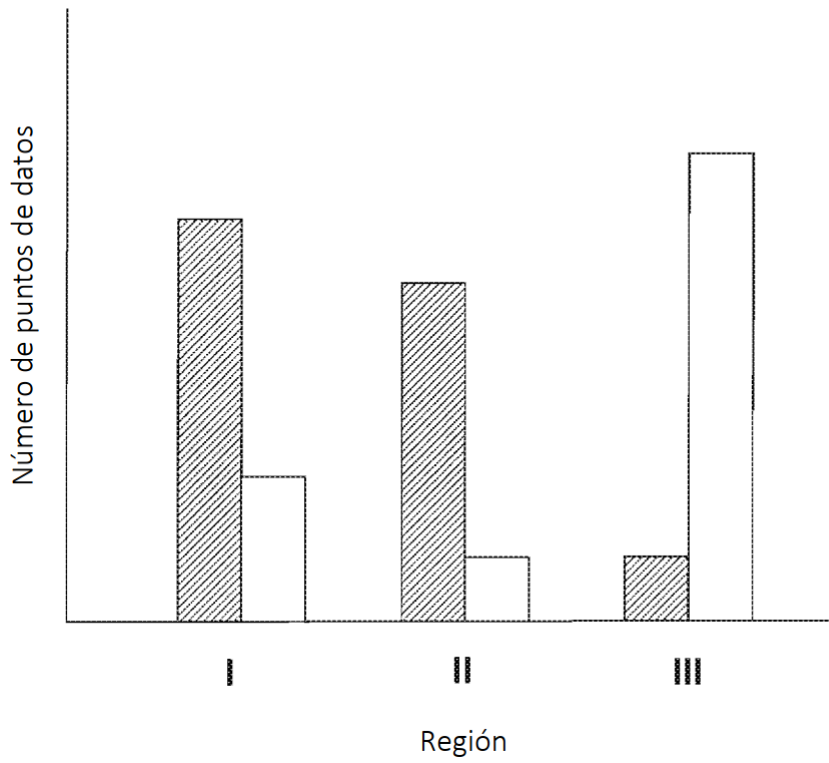


Fig. 1I

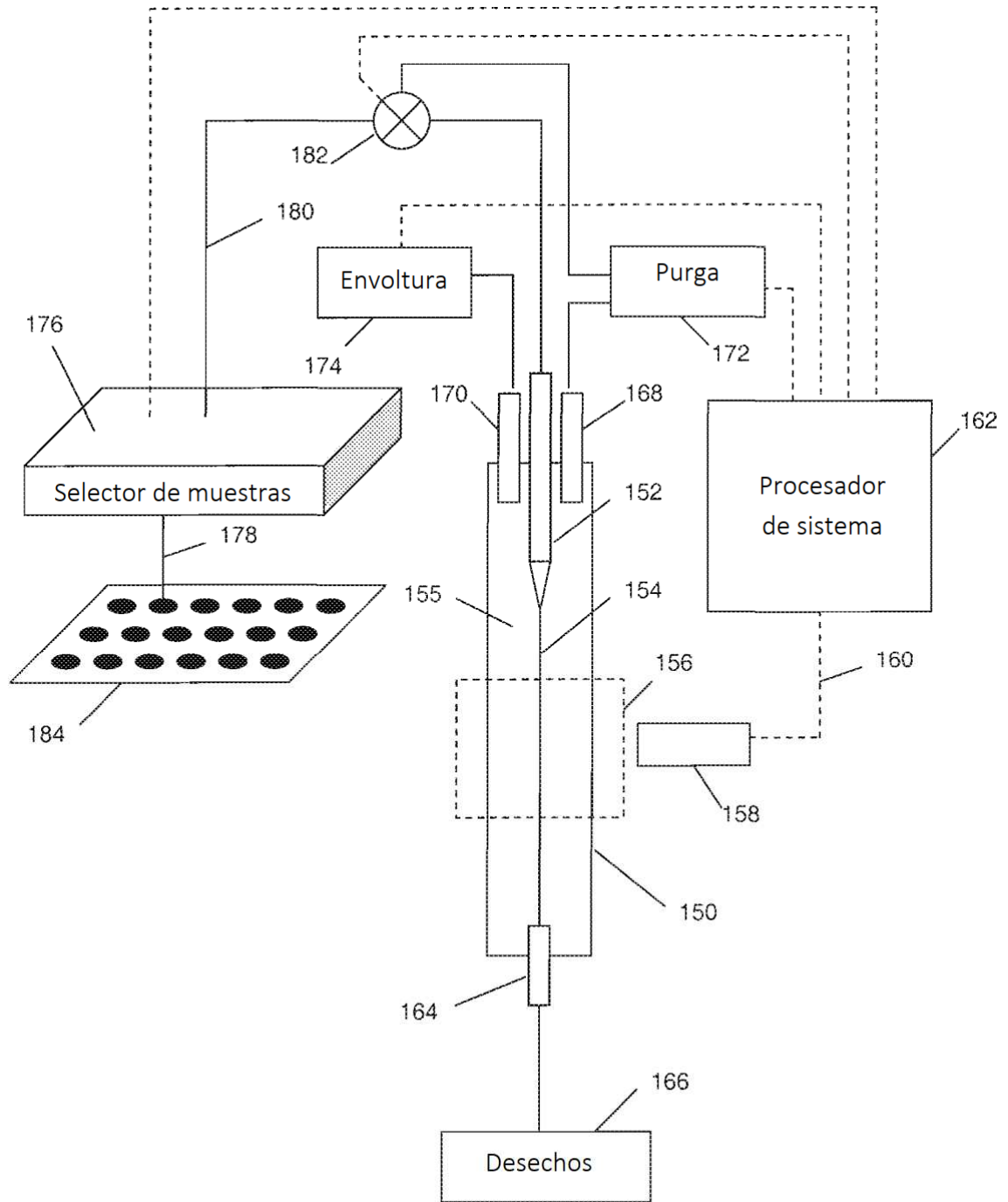


Fig. 1J

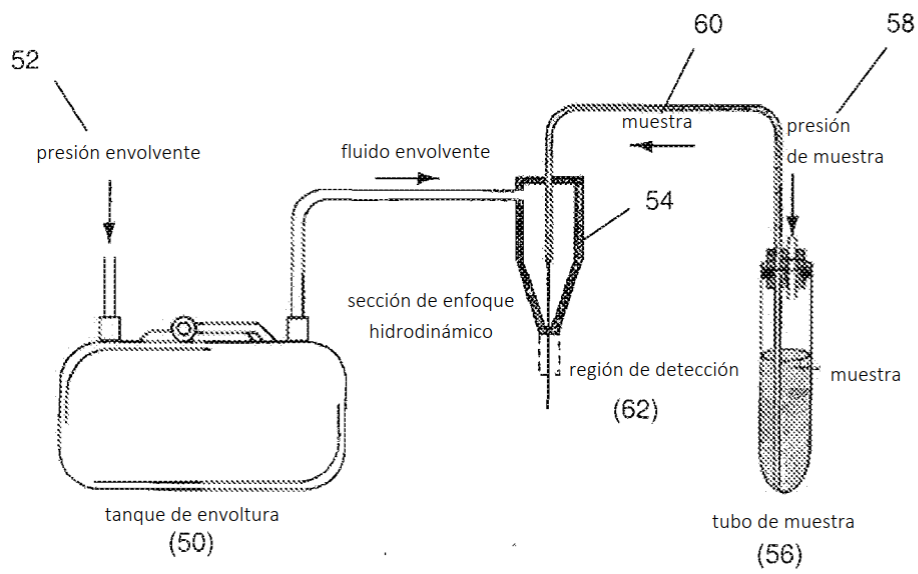


Fig. 1K

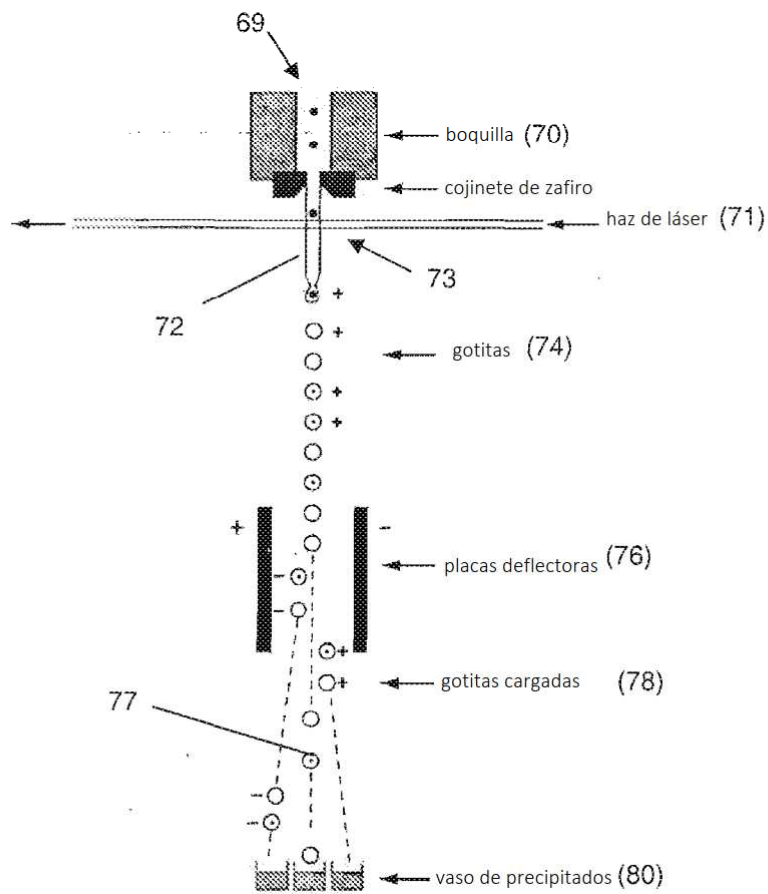


Fig. 1L

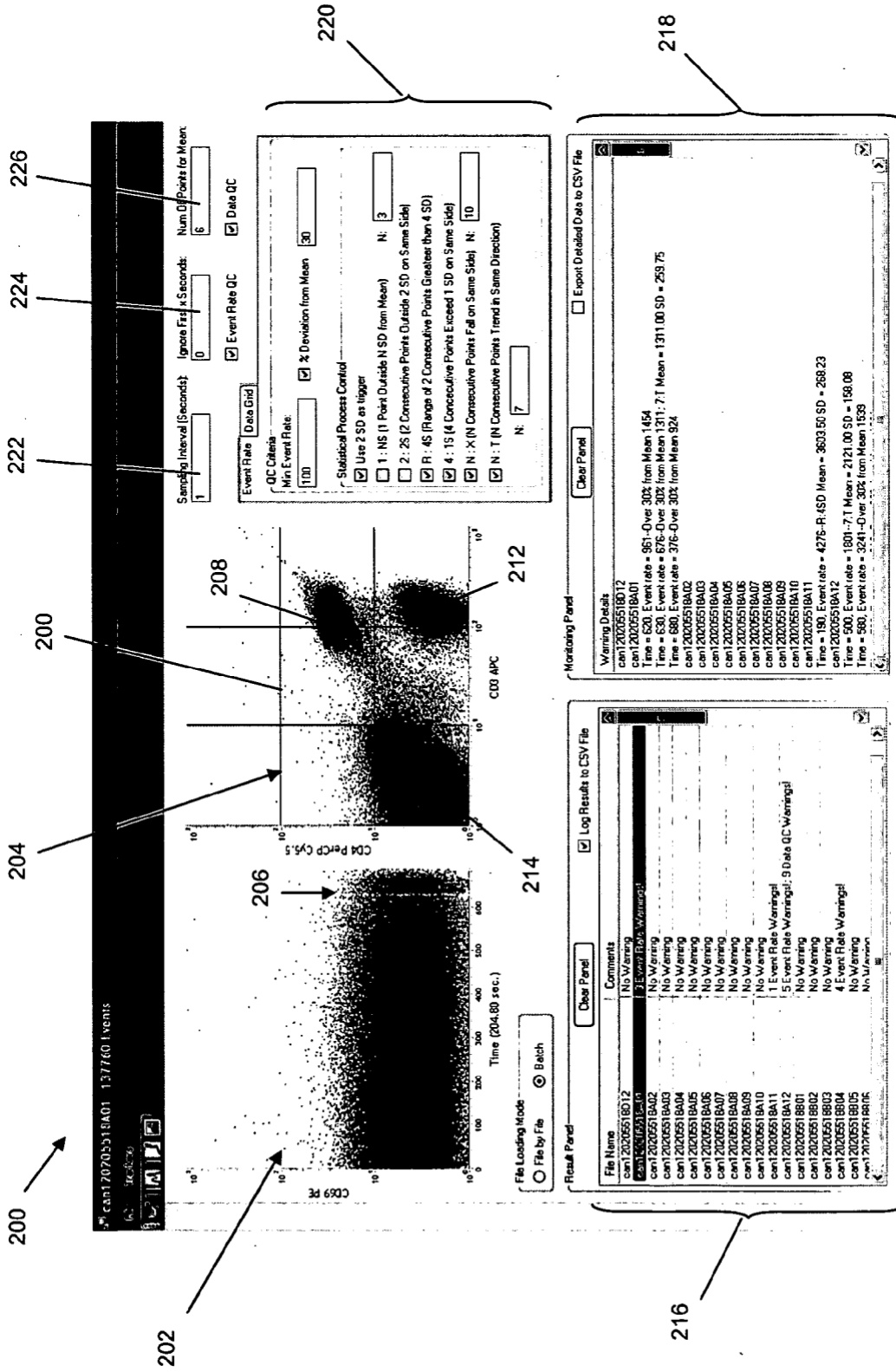


Fig. 2A

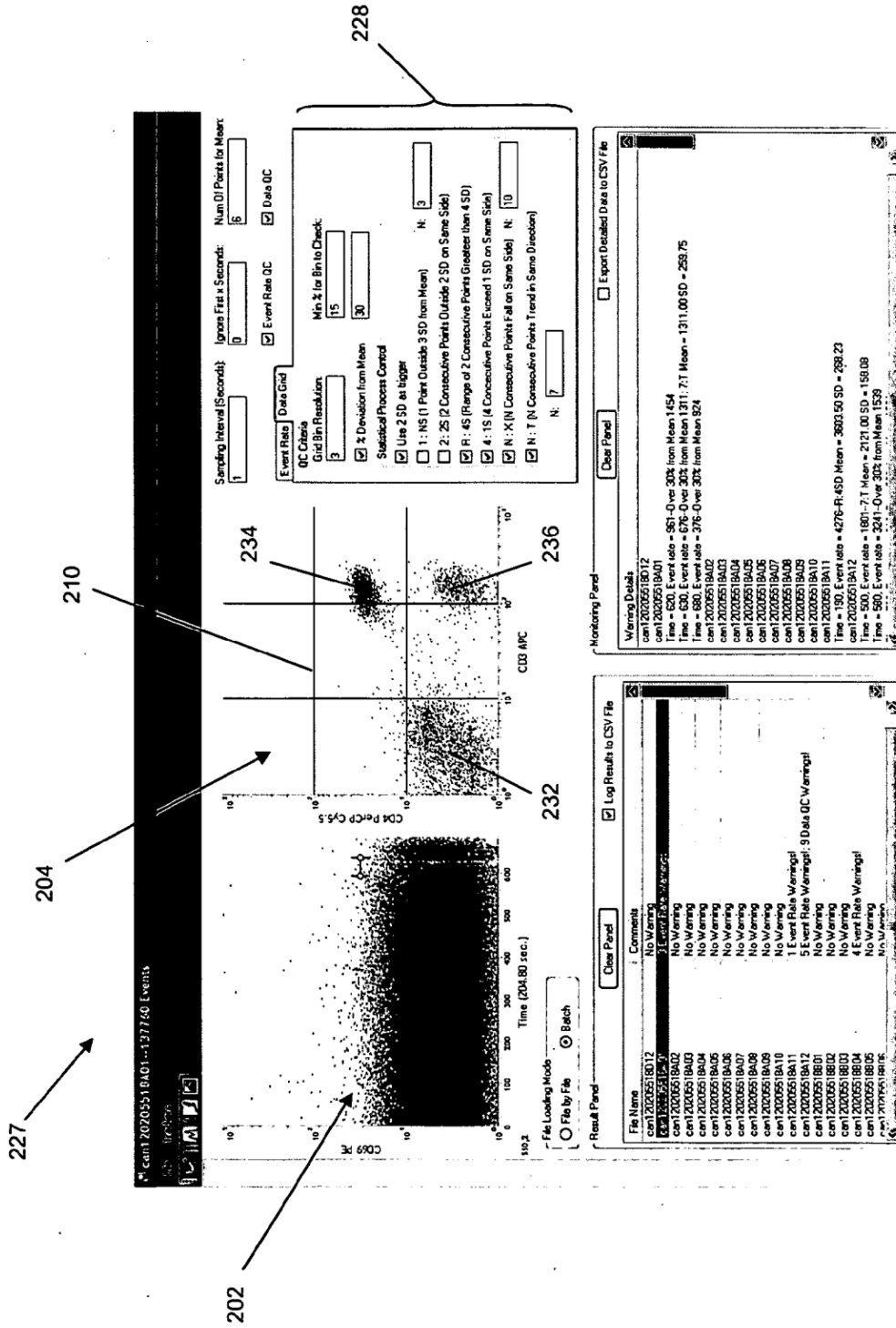


Fig. 2B