

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 682**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/1429** (2014.01)

**G01N 15/14** (2014.01)

**G01N 15/10** (2014.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2020 PCT/US2020/013549**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2020 WO20154135**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2020 E 20703918 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024 EP 3914896**

54 Título: **Citometría de flujo con análisis de datos para una dilución optimizada de muestras de fluido para la investigación de la citometría de flujo**

30 Prioridad:

**21.01.2019 US 201916253060**

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

**16.12.2024**

73 Titular/es:

**SARTORIUS BIOANALYTICAL INSTRUMENTS,  
INC. (100.0%)  
565 Johnson Avenue  
Bohemia, NY 11716, US**

72 Inventor/es:

**GATES, TYLER y  
STEAFFENS, JEFFREY**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 992 682 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

Citometría de flujo con análisis de datos para una dilución optimizada de muestras de fluido para la investigación de la citometría de flujo

### Campo

Esta descripción se refiere a la citometría de flujo, incluyendo los sistemas y métodos para el análisis de datos de los resultados de la citometría de flujo.

### Antecedentes

La citometría de flujo es una técnica analítica que se utiliza en un número de aplicaciones para medir las propiedades físicas y/o químicas de partículas biológicas o no biológicas a medida que fluyen en una muestra de fluido a través de una zona de investigación en una célula de investigación, comúnmente denominada célula de flujo. El flujo a través de la célula de flujo puede investigarse en la zona de investigación mediante una variedad de técnicas, que incluyen someter el flujo a radiación de excitación que incluye, por ejemplo, señales eléctricas, acústicas y/u ópticas y medir y analizar las respuestas para detectar y evaluar partículas en una muestra de fluido. Aunque el fluido de muestra puede investigarse sometiendo el fluido de muestra a una variedad de estímulos, la exposición de la muestra a la luz es una técnica de estímulo común. La luz dispersa o una emisión fluorescente que sale de la célula de flujo puede detectarse y analizarse para proporcionar información sobre las características de las partículas presentes en el fluido de muestra. Las técnicas de estimulación de luz y detección de luz pueden adaptarse a la identificación de características particulares indicativas de la presencia de tipos particulares de partículas. Por ejemplo, una técnica consiste en manchar un fluido de muestra con uno o más manchas (también denominados tintes) que se asocian con un componente biológico particular de interés. Las manchas pueden tener una actividad fluorescente que proporciona una emisión fluorescente alrededor de una longitud de onda particular, cuya detección proporciona una indicación de la presencia de ese componente biológico.

Los dispositivos para realizar la citometría de flujo se denominan generalmente citómetros de flujo. Los citómetros de flujo a menudo se diseñan para optimizar la detección de un tipo específico de partícula, por ejemplo, células específicas, bacterias, virus o partículas similares a virus. Un problema que complica la robustez y durabilidad de los citómetros de flujo durante un período prolongado es que los citómetros de flujo tienden a ser instrumentos muy sensibles que requieren un control muy preciso sobre un número de factores que afectan el rendimiento del instrumento. Se pueden introducir errores en el análisis de los resultados de la citometría de flujo a partir de errores relacionados con los instrumentos (tal como la alineación de los elementos ópticos para un rendimiento óptimo), errores relacionados con la química (por ejemplo, mezcla de colorantes, eficacia de unión de tintes y muestras, etc.) y errores relacionados con el operador. A su vez, cualquiera de estas tres fuentes generales de errores puede inducir ruido u otros errores que pueden degradar la exactitud y/o precisión de los resultados de la citometría de flujo para una investigación por citometría de flujo dada.

En relación con los errores relacionados con los instrumentos, un citómetro de flujo puede experimentar una degradación en el rendimiento en relación con la detección de partículas en los fluidos de muestra que contienen concentraciones de partículas muy bajas y concentraciones de partículas muy altas. Por ejemplo, en muestras de fluidos con concentraciones de partículas muy bajas, las señales de partículas individuales son difíciles de distinguir de las señales de fondo. A concentraciones de partículas muy altas, las partículas tienen una mayor tendencia a agregarse y a atravesar la zona de investigación como agregados en lugar de uno en uno. Como tal, un citómetro de flujo puede tener un intervalo dinámico con respecto a la concentración de partículas en un fluido de muestra en el que el citómetro de flujo proporciona una exactitud aceptable de identificación y recuento de partículas. Sin embargo, dicho intervalo dinámico puede ser particular para un instrumento dado y/o para la investigación de una reserva de un fluido de muestra particular para identificar partículas de un tipo particular y con atributos de partícula particulares. En este sentido, incluso en un citómetro de flujo con características de rendimiento conocidas del instrumento, el intervalo dinámico para una investigación dada para un tipo de partícula particular en un medio de fluido particular puede no conocerse con precisión antes de iniciar una investigación. Estos problemas se agravan aún más en las investigaciones por citometría de flujo dirigidas a la cuantificación de partículas muy pequeñas, tal como las que se encuentran en el intervalo del tamaño de las partículas de virus individuales (viriones), que pueden tener un tamaño tan pequeño como de decenas de nanómetros. Distinguir las señales fluorescentes de las partículas en relación con las señales de fondo se hace más difícil con partículas más pequeñas, y la aplicabilidad de la detección por dispersión de luz con fines de identificación de partículas y de separación resulta menos viable. Un ejemplo de citómetro de flujo diseñado para la detección y el recuento de partículas del tamaño de un virus mediante el uso de manchas fluorescentes es el citómetro de flujo Virus Counter® 3100 (Sartorius Stedim Biotech), que funciona con una velocidad de flujo de muestra de fluido muy bajo a través de una zona de investigación de células de flujo, y que incluye mediante el uso de manchas fluorogénicas no específicas para la unión no específica al contenido de proteínas o ácidos nucleicos o manchas de anticuerpos fluorescentes para unirse a un sitio de unión específico (epítipo).

Las soluciones propuestas anteriormente para abordar la degradación potencial de la exactitud debida a muestras fuera del intervalo dinámico de un instrumento y para abordar las diversas fuentes de error discutidas explicadas por

citometría de flujo de múltiples réplicas de muestras en cada una de una pluralidad de diluciones diferentes, en un amplio intervalo de diluciones, de una reserva de fluido de muestra que se va a investigar. Esta técnica ha sido particularmente aplicable en las evaluaciones de citometría de flujo para cuantificar las partículas en un intervalo de tamaños de partículas de virus. Es importante realizar múltiples réplicas de muestras en cada dilución para evaluar la consistencia dentro de la muestra en cada nivel de dilución. El muestreo en múltiples diluciones diferentes es importante para abarcar un intervalo de concentración de partículas que probablemente esté dentro del intervalo dinámico del instrumento de citometría de flujo para la investigación. A su vez, los resultados de la citometría de flujo de las múltiples réplicas de muestras en el amplio intervalo de factores de dilución para una reserva de muestra dada dan como resultado un gran número de investigaciones por citometría de flujo que deben realizarse. Además, en este enfoque se produce un conjunto de datos correspondientemente grande. Se pueden aplicar enfoques estadísticos a estos datos para proporcionar resultados relacionados con la reserva de fluido de muestra, tal como para determinar la concentración de las partículas en la reserva de fluido de muestra. Dichos enfoques estadísticos para grandes conjuntos de datos pueden requerir una mayor capacidad y/o tiempo de procesamiento. Por ejemplo, se pueden preparar tres réplicas de muestras de fluido en factores de dilución de 10, 100, 1000 y 10.000 en relación con la reserva de fluido de muestra que se está investigando, lo que da lugar a la preparación y citometría de flujo de 12 muestras de fluido, y el posterior análisis de datos y almacenamiento informático de los resultados de la citometría de flujo para todas las muestras de fluido para garantizar una evaluación razonable para una única reserva de fluido de muestra. Como puede apreciarse, dicho procesamiento requiere un tiempo y coste significativos. Además, dicho proceso requiere a menudo que haya cantidades relativamente grandes de reserva de fluido de muestra disponibles para permitir la preparación de las múltiples réplicas de muestras en un amplio intervalo de factores de dilución. Además, este enfoque también introduce la oportunidad de aumentar los errores, ya que las condiciones pueden ser variables a lo largo de las muchas investigaciones por citometría de flujo requeridas. A su vez, la precisión y/o exactitud de los resultados pueden verse afectadas negativamente. Además, dicho análisis de datos se ha realizado en gran medida en entornos de procesamiento separados del instrumento de la citometría de flujo, de modo que no se aplique ninguna aplicación estandarizada o consistente de técnicas de procesamiento de datos a dichos resultados. Más bien, cada operador individual de un citómetro de flujo puede procesar los datos de forma única, lo que presenta además una oportunidad para la introducción de errores relacionados con el operador en el procesamiento.

El documento US 2006/0195268 A1 describe un método particular para determinar el título de los agentes biológicos que interactúan con las células objetivo vivas, que incluye: la incubación de un agente biológico a una concentración inicial desconocida con células objetivo a una concentración constante; medición en diversos momentos sucesivos de la intensidad de una señal del agente biológico y las células objetivo; y determinación de la concentración inicial del agente biológico con la ayuda de una curva estándar preestablecida para un agente biológico estándar.

El documento US 2008/0100840 A1 describe un método particular para analizar partículas en un fluido de muestra, que incluye: disponer un fluido de muestra para formar una corriente de fluido de muestra de profundidad y anchura controladas; adquirir una secuencia de imágenes fijas ampliadas de la corriente de fluido de muestra tomadas perpendicularmente a: la dirección del flujo y a la anchura de dicha corriente de fluido de muestra; y detectar y contar imágenes de partículas de la corriente de fluido de muestra. La detección incluye ajustar los niveles de iluminación de la corriente de fluido de muestra para minimizar el nivel de ruido; medir un nivel real de iluminación utilizado para obtener una imagen en particular; restar una imagen de fondo de las imágenes de la corriente de fluido de muestra y formar imágenes de partículas con el fondo corregido; y establecer un umbral para las imágenes con el fondo corregido.

El documento WO 2016/048872 A1 describe un método particular para preparar una población de células dendríticas inmunopotentes que se activan *in vitro* con un antígeno específico del tumor derivado de un paciente, y en el que la inmunopotencia de las células dendríticas preparadas se mide mediante una cantidad de biomarcador producido por las células dendríticas. El biomarcador se mide mediante un inmunoensayo, por ejemplo, mediante Western blot, ELISA o citometría de flujo.

## Resumen

El problema técnico subyacente se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones independientes. Las realizaciones adicionales se definen en las reivindicaciones dependientes.

En vista de lo anterior, la presente descripción se refiere generalmente a métodos de citometría de flujo y sistemas de citometría de flujo que proporcionan un análisis de datos de los resultados de la citometría de flujo para proporcionar una precisión y/o exactitud mejoradas de una investigación de una reserva de fluido de muestra objetivo mediante un citómetro de flujo. Específicamente, la presente descripción generalmente se refiere a métodos de citometría de flujo y sistemas de citometría de flujo que son capaces de determinar de manera eficiente un intervalo del factor de dilución optimizado para la investigación por citometría de flujo de una reserva de fluido de muestra objetivo. A su vez, el título de la reserva de fluido de una muestra objetivo puede realizarse mediante la investigación de muestras de fluido objetivo optimizadas en el intervalo del factor de dilución optimizado. Los enfoques descritos en la presente memoria pueden facilitar una reducción del error con respecto a los errores relacionados con los instrumentos, los errores relacionados con la química y los errores relacionados con el operador en la investigación de la citometría de flujo. En consecuencia, se puede facilitar una investigación por citometría de flujo más exacta y precisa, mejorando así la

funcionalidad de un sistema de citometría de flujo que emplea los enfoques de análisis de datos descritos en la presente memoria.

5 En general, la presente descripción incluye un sistema de citometría de flujo que incluye un módulo de ensayo de  
detección y un módulo de ensayo de título. El módulo de ensayo de detección funciona para determinar un intervalo  
del factor de dilución optimizado en el que un citómetro de flujo del sistema de citometría de flujo es más preciso  
basándose en un análisis de los resultados de la citometría de flujo a partir de una pluralidad de muestras de fluido  
objetivo de detección. El módulo de análisis de detección puede proporcionar asistencia (por ejemplo, asistencia  
10 automatizada) en relación con el procesamiento de datos para determinar el intervalo del factor de dilución optimizado,  
por ejemplo, proporcionando capacidades de orientación al operador y/o de confirmación de datos en relación con el  
procesamiento de los resultados de la citometría de flujo para la determinación del intervalo del factor de dilución  
optimizado. Como se usa en la presente memoria, el intervalo del factor de dilución optimizado es uno o más factores  
de dilución de la muestra dentro de un límite superior y un límite inferior del factor de dilución. El intervalo del factor  
15 de dilución es inclusivo del límite superior e inferior, e incluye situaciones en las que el límite superior y el límite inferior  
son los mismos, es decir, cuando un intervalo del factor de dilución optimizado de la muestra se identifica como un  
valor de factor de dilución único.

A su vez, el módulo de ensayo de títulos puede determinar los resultados de título de las partículas (por ejemplo, la  
concentración de partículas en una reserva de fluido de muestra que se está investigando) basándose en los  
20 resultados de la citometría de flujo de una pluralidad de muestras de fluido objetivo optimizadas que se diluyen dentro  
del intervalo del factor de dilución optimizado. El módulo de ensayo de títulos también puede proporcionar asistencia  
(por ejemplo, asistencia automatizada) en relación con el procesamiento de muestras de fluido objetivo optimizadas  
en el intervalo del factor de dilución optimizado para determinar los resultados de título de las partículas para una  
reserva de muestras objetivo. Una vez más, la asistencia proporcionada por el módulo de ensayo de títulos puede  
25 incluir capacidades de orientación al operador y/o confirmación de datos.

Tal como se utilizan en la presente memoria, ciertos procesos relacionados con el funcionamiento del módulo de  
ensayo de detección y/o el módulo de ensayo de títulos proporcionan la confirmación de que los parámetros  
pertenecen a valores aceptables para un parámetro dado. Además, en los casos en los que un parámetro dado no se  
30 considera un valor aceptable, se puede presentar una notificación de datos a un usuario. Como se apreciará en la  
explicación que sigue, dichas notificaciones pueden proporcionar una advertencia a un usuario para permitir a un  
usuario confirmar los cálculos o determinaciones en función de un parámetro dado que proporciona la fuente de la  
notificación. En ciertas realizaciones, dicha notificación puede impedir el funcionamiento posterior de un módulo hasta  
que y a menos que se aborde un parámetro o condición que genere la notificación. En este sentido, dichas  
35 notificaciones de datos pueden proporcionar ciertas confirmaciones o comprobaciones en relación con los parámetros  
o condiciones relacionados con el funcionamiento del módulo de ensayo de detección y/o del módulo de ensayo de  
títulos. Cualquier confirmación o comprobación de los datos descritos en la presente memoria pretende estar  
relacionada con el funcionamiento específico del módulo de ensayo de detección y/o el módulo de ensayo de títulos y  
no refleja las confirmaciones o comprobaciones de la exactitud de los resultados de la citometría de flujo subyacentes  
40 utilizados en el procesamiento del módulo de ensayo de detección y/o el módulo de ensayo de títulos. Es decir, al  
proporcionar una confirmación instrumental de la aceptabilidad de un parámetro o condición, incluso si están  
relacionada con los resultados de la citometría de flujo seleccionados por un usuario para su uso en la determinación  
de un intervalo del factor de dilución optimizado, las realizaciones presentadas en la presente memoria no pretenden  
proporcionar ninguna evaluación cualitativa de la exactitud absoluta de los resultados de la citometría de flujo utilizados  
45 en relación con el módulo de ensayo de detección y/o el módulo de ensayo de títulos.

El enfoque anterior para determinar un intervalo del factor de dilución optimizado con la investigación por citometría  
de flujo de una pluralidad de muestras de fluido objetivo optimizadas que se diluyen dentro del intervalo del factor de  
50 dilución optimizado puede proporcionar una número de ventajas técnicas específicas en relación con el funcionamiento  
de un sistema de citometría de flujo. En particular, la determinación del intervalo del factor de dilución optimizado tal  
como se ha descrito anteriormente facilita un sistema y un proceso resultante más eficaces de varias maneras.  
Inicialmente, se puede proporcionar un módulo de ensayo de detección que pueda acceder a los resultados de la  
citometría de flujo para una pluralidad de muestras de fluido objetivo de detección. Las muestras de fluido objetivo de  
55 detección pueden incluir una serie de diluciones de una reserva de muestras de detección que se diluye en una  
pluralidad de factores de dilución. En al menos una realización de la presente descripción, el módulo de ensayo de  
detección puede proporcionar un número limitado de muestras de fluido objetivo de detección (por ejemplo, una sola  
muestra en cada factor de dilución) para su análisis por parte del módulo de ensayo de detección. A su vez, puede ser  
necesario someter a una investigación por citometría de flujo menos muestras de fluido objetivo de detección (por  
60 ejemplo, en relación con los enfoques propuestos anteriormente que utilizan múltiples réplicas de muestras en cada  
uno de los múltiples factores de dilución) para determinar el intervalo del factor de dilución optimizado para su  
funcionamiento dentro de un intervalo dinámico para un instrumento de citometría de flujo dado y una reserva de  
muestras objetivo dada para ser analizados por el citómetro de flujo. Un conjunto de múltiples réplicas de muestras de  
fluido preparadas dentro del intervalo de dilución optimizado identificado puede someterse después a citometría de  
65 flujo y analizarse los resultados para proporcionar los resultados del título de partículas para una reserva de muestra  
objetivo con un grado de confianza razonable, ya que se han realizado en una parte de alto rendimiento del intervalo  
dinámico para la situación particular del instrumento y la muestra.

5 Esto puede proporcionar una serie de ventajas con respecto a los instrumentos y métodos de citometría de flujo anteriores. Inicialmente, dado que pueden requerirse menos réplicas de muestra en cada factor de dilución, puede reducirse el volumen total de la reserva de fluido de muestra de detección necesario para determinar el intervalo del factor de dilución. Esto puede ser particularmente ventajoso en contextos con un suministro limitado de reserva de fluido de muestra de detección que, de otro modo, podría impedir la realización del análisis de un gran número de réplicas en cada factor de dilución. Además, la posibilidad de errores relacionados con el operador puede reducirse a medida que se reduce la participación total del operador en la preparación y ejecución del detección de las muestras de fluido objetivo.

10 Además, el tiempo requerido para realizar la investigación por citometría de flujo en el número reducido de muestras de fluido objetivo de detección puede reducirse en consecuencia. Esto no solo proporciona eficiencias en relación con el tiempo requerido para realizar el análisis, sino que también permite un análisis más compacto que reduce el potencial de introducción de errores al realizar una investigación por citometría de flujo de cada una de las muestras de fluido. Puede entenderse que el proceso de citometría de flujo puede estar sujeto a variables dependientes del tiempo que introducen errores en la investigación por citometría de flujo, de modo que la cantidad de error o variabilidad en el proceso aumenta con el tiempo. Como tal, proporcionar un análisis temporalmente más compacto puede reducir dicho error o variabilidad dependiente del tiempo.

15 Además, el número reducido de muestras de fluido objetivo de detección requeridas para determinar el intervalo del factor de dilución optimizado también puede reducir los recursos computacionales requeridos para proporcionar resultados de la citometría de flujo. Como puede apreciarse, la realización del análisis de datos para un gran número de investigaciones por citometría de flujo puede requerir recursos de procesamiento y/o recursos de memoria sustanciales de un entorno computacional en el que se realiza el análisis. Al limitar el número de muestras de fluido objetivo de detección utilizadas, se puede lograr una reducción correspondiente en los recursos computacionales. Además, dado que los módulos descritos en la presente memoria pueden acceder directamente a los resultados de la citometría de flujo almacenados en la memoria, la eficiencia del procesamiento de los resultados más limitados puede aumentarse aún más, proporcionando así un entorno de procesamiento computacional global más eficiente en el que se hace funcionar el citómetro de flujo.

20 Además, incluso cuando se consideran las muestras de fluido objetivo optimizadas, se puede realizar una evaluación de citometría de flujo completa con una confianza de exactitud aceptable para una reserva de muestras objetivo con un número total reducido de muestras de fluido objetivo. Esto puede incluir una reducción en el procesamiento del análisis de datos y el almacenamiento informático consumidos, lo que también puede proporcionar una reducción correspondiente del consumo de energía eléctrica para el funcionamiento del instrumento y el análisis de datos. Por ejemplo, en el ejemplo de la técnica anterior mencionado en la sección de Antecedentes anterior, utilizando tres réplicas de muestras de fluido objetivo preparadas con cada factor de dilución de 10, 100, 1000 y 10.000, se preparan y procesan un total de 12 muestras de fluido objetivo para una evaluación completa de una reserva de fluido de muestra objetivo. Sin embargo, con la implementación de una técnica de esta descripción, se puede obtener una evaluación de una confianza comparable en términos de exactitud del resultado para la reserva de muestras objetivo procesando un número significativamente menor de muestras de fluido objetivo. Por ejemplo, la eficiencia puede lograrse preparando y procesando una muestra de fluido objetivo de detección en cada uno de los factores de dilución indicados para obtener un intervalo del factor de dilución optimizado con el funcionamiento del módulo de ensayo de detección. A su vez, se pueden preparar y someter a investigación un total de cuatro muestras de fluido objetivo de detección, seguidas de la preparación y el procesamiento de tres muestras de fluido objetivo optimizadas en un solo factor de dilución dentro del intervalo del factor de dilución optimizado para obtener resultados del título de las partículas con el funcionamiento del módulo de ensayo de títulos. Como consecuencia, en este ejemplo de la presente descripción se realiza una evaluación comparable de la reserva de muestras objetivo con la preparación y el procesamiento de solo siete muestras de fluido objetivo (cuatro muestras de fluido objetivo de detección más tres muestras de fluido objetivo optimizadas) en lugar de 12 muestras de fluido objetivo para el ejemplo de la técnica anterior correspondiente. Además, como consecuencia, se consume menos reserva de muestra objetivo, se requiere menos tiempo para preparar las muestras de fluido objetivo y someter esas muestras de fluido objetivo a citometría de flujo, se consume menos capacidad de productividad del citómetro de flujo, se usa menos capacidad de procesamiento informático para el análisis de datos, se usa menos almacenamiento informático para almacenar un número menor de resultados de la citometría de flujo y se consume menos energía para el funcionamiento del citómetro de flujo y para el procesamiento de datos. Además, la capacidad de productividad del instrumento de citometría de flujo aumenta para el número de reservas de muestras objetivo que pueden evaluarse mediante el instrumento de citometría de flujo y se consume menos desgaste del instrumento por cada dicha evaluación de una reserva de muestras objetivo.

25 Además, los métodos de citometría de flujo y los sistemas de citometría de flujo de la presente descripción pueden emplearse de manera beneficiosa para la cuantificación de partículas objetivo de cualquier tipo particular mediante la evaluación de citometría de flujo. Dichas partículas objetivo pueden ser células, que pueden tener, por ejemplo, un tamaño de varias a decenas de micras, u otras partículas de material biológico de tamaño similar. Sin embargo, en algunas implementaciones preferidas, los métodos y sistemas son particularmente beneficiosos para la cuantificación de partículas objetivo que son muy pequeñas y, en particular, que son del tamaño de un virus. Dichas partículas objetivo del tamaño de un virus pueden, en algunas implementaciones, tener un tamaño de partícula igual o inferior a 2 micras,

1 micra, 600 nanómetros, 300 nanómetros o un tamaño de partícula máximo incluso menor. Dichas partículas objetivo del tamaño de un virus pueden, en algunas implementaciones, tener un tamaño de partícula de al menos 10 nanómetros, 20 nanómetros, 30 nanómetros o un tamaño de partícula mínimo incluso mayor. El tamaño de partícula identificado anteriormente se refiere a una dimensión transversal máxima de las partículas. Dichas partículas objetivo del tamaño de un virus pueden ser, por ejemplo, viriones (partículas de virus libres que no forman parte de una unidad mayor, tal como una célula infectada), partículas similares a virus, exosomas o microvesículas. Los viriones o partículas similares a virus pueden ser de tipo envuelto o no envuelto. Dichos viriones o partículas similares a virus pueden ser o tener atributos de virus de cualquier familia de virus. Algunos ejemplos de virus son el virus de la gripe, el baculovirus, el adenovirus, el virus adenoasociado, el enterovirus, el lentivirus, el virus diminuto de ratones, el rotavirus, el parvovirus y el virus de la leucemia felina.

Las referencias a partículas en la presente memoria se refieren generalmente a dichas partículas en un estado no asociado, es decir, que no forman parte de una unidad de partículas sustancialmente mayor. Por partícula del tamaño de un virus y no asociada se entiende que la partícula no forma parte de una estructura de partículas mayor que es mayor que el tamaño de un virus, por ejemplo, la partícula no asociada no está dentro de una célula huésped o unida a una microesfera o perla de inmunoensayo o es parte de un aglomerado que es mayor que el tamaño del virus. Se apreciará que las partículas objetivo que están etiquetadas con una mancha fluorescente para la detección por citometría de flujo mediante la respuesta de emisión fluorescente pueden ser algo más grandes que la partícula objetivo no etiquetada debido a la masa añadida de la etiqueta fluorescente. Sin embargo, las referencias en la presente memoria al tamaño de las partículas y, en particular, las referencias a partículas del tamaño de un virus pueden hacer referencia al tamaño de las partículas objetivo no asociadas antes de la tinción y/o a las partículas objetivo manchadas, incluyendo la masa añadida de una mancha fluorescente que se adhiere a las partículas objetivo. Cuando las moléculas colorantes fluorogénicas que se adhieren a una partícula del tamaño de un virus (por ejemplo, un virión, un exosoma, una partícula similar a un virus o una microvesícula) proporcionan una mancha fluorescente, el tamaño añadido de las moléculas de tinte adheridas generalmente no aumenta apreciablemente la magnitud del tamaño de la partícula manchada no asociada resultante, de modo que la partícula manchada no asociada también es del tamaño de un virus, aunque sea ligeramente mayor que la partícula no manchada. De manera similar, para una mancha de anticuerpos fluorescentes, la partícula manchada será más grande que la partícula no manchada, pero seguirá teniendo el tamaño de un virus. Algunos ejemplos típicos de manchas de anticuerpos fluorescentes pueden tener un tamaño del orden de aproximadamente 7 nanómetros y, por lo tanto, pueden añadir del orden de aproximadamente 14 nanómetros al tamaño relativo a la partícula no manchada cuando la mancha de anticuerpo fluorescente se une directamente a la partícula objetivo. El aumento del tamaño de la partícula con la tinción puede ser algo mayor para la unión indirecta de una mancha de anticuerpo fluorescente, en la que un anticuerpo primario se une a la partícula objetivo y un anticuerpo secundario con fluoróforo se une al anticuerpo primario para proporcionar un etiqueta fluorescente en una partícula.

Se presentan diversos aspectos y realizaciones de implementaciones de ejemplo en la siguiente descripción, incluyendo las reivindicaciones, y en los dibujos.

#### 40 **Breve descripción de los dibujos**

Las Figuras 1A-1B son vistas en perspectiva y laterales de una realización de un instrumento de citómetro de flujo.

Las Figuras 2A-2D son una vista en perspectiva, superior y desde un extremo de una realización de un montaje interno de citómetro de flujo que puede incluirse dentro del instrumento de citómetro de flujo de las Figuras 1A-1B.

La Figura 3 es una vista esquemática de una realización de un sistema de citometría de flujo que incluye un módulo de ensayo de detección y un módulo de ensayo de títulos.

Las Figuras 4-8 son representaciones que ilustran los resultados de la citometría de flujo presentados para su análisis para determinar un intervalo dinámico de un instrumento para procesar una reserva de fluido de muestra objetivo y para determinar un intervalo del factor de dilución optimizado para el mismo.

La Figura 9 es una realización de una pantalla de una interfaz gráfica de usuario que proporciona un listado de resultados correspondiente a los resultados de la citometría de flujo.

La Figura 10 es una realización de una pantalla de una interfaz gráfica de usuario para su uso en la selección de resultados de la citometría de flujo para el procesamiento de datos.

La Figura 11 es una realización de una pantalla de una interfaz gráfica de usuario para el control y la interacción de un módulo de ensayo de detección para determinar un intervalo del factor de dilución optimizado.

La Figura 12 es una realización de la pantalla de la Figura 11 en la que se ha determinado una determinación del intervalo del factor de dilución optimizado y se muestra a un usuario.

65

La Figura 13 es una realización de la pantalla de la Figura 11 en la que se ha determinado y se muestra a un usuario una determinación del intervalo del factor de dilución optimizado, y en la que está presente una indicación de notificación de datos.

5 La Figura 14 es una realización de una pantalla que muestra un listado detallado de notificaciones de datos en relación con la indicación de notificación de datos presentada en la figura 13.

10 La Figura 15 es una realización de una pantalla de una interfaz gráfica de usuario para el control y la interacción de un módulo de ensayo de títulos para determinar los resultados de títulos de partículas para muestras de fluido objetivo optimizadas en el intervalo del factor de dilución optimizado.

La Figura 16 es una realización de la pantalla de la Figura 15 en la que se han determinado los resultados de títulos de partículas y está presente una indicación de notificación de datos.

15 La Figura 17 es una representación que ilustra una relación de un límite de calificación de la muestra con respecto a los resultados de la citometría de flujo.

### Descripción detallada

20 Aunque la invención es susceptible de diversas modificaciones y formas alternativas, se han mostrado realizaciones específicas de la misma a modo de ejemplo en los dibujos y se describen en detalle en la presente memoria. Sin embargo, debe entenderse que no se pretende limitar la invención a la forma particular descrita, sino que, por el contrario, la invención debe cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que se encuentren dentro del alcance de la invención como se define por las reivindicaciones.

25 Como se usa en la presente memoria, una reserva de muestra, o una reserva de fluido de muestra, se refiere a un lote de material con un medio de fluido y que es objeto de investigación mediante la investigación por citometría de flujo para la presencia de partículas con atributos o propiedades particulares de las partículas, y dichas partículas que son objeto de investigación reciben el nombre en la presente memoria de partículas objetivo. Dicha reserva de muestras puede ser, por ejemplo, un lote de muestras recolectado de un proceso biológico o que resulta del procesamiento adicional de dicho lote de muestras recolectado, por ejemplo, el procesamiento de purificación. Se preparan múltiples muestras de fluido para el procesamiento por citometría de flujo utilizando porciones de dicha reserva de muestras, por ejemplo, para preparar muestras de fluido a diferentes diluciones o para preparar múltiples réplicas de muestras de fluido al mismo nivel de dilución. La reserva de muestras objetivo se refiere a una reserva de muestras de este tipo que es un objeto final de cuantificación para las partículas objetivo y que se usa para preparar un conjunto objetivo optimizado con múltiples muestras de fluido objetivo optimizadas, cada una diluida dentro de un intervalo del factor de dilución de muestra optimizado. La reserva de muestras de detección se refiere a la reserva de muestras que se utiliza para preparar un conjunto objetivo de detección con múltiples muestras de fluido objetivo de detección utilizadas para determinar el intervalo del factor de dilución optimizado mediante la ejecución del módulo de ensayo de detección. En las implementaciones preferidas, la reserva de muestras objetivo y la reserva de muestras objetivo de detección son la misma reserva de muestras, que se usa tanto para preparar muestras de fluido objetivo de detección, para procesarlas a fin de determinar el intervalo de factores de dilución optimizado con la ejecución del módulo de ensayo de detección, como para preparar muestras de fluido objetivo optimizadas para su procesamiento para determinar los resultados de título de partículas con la ejecución del módulo de ensayo de títulos. Sin embargo, en algunas implementaciones alternativas, la reserva de muestras de detección puede ser una reserva de muestra diferente a la reserva de muestra objetivo, aunque en dichas implementaciones, la reserva de muestras de detección y la reserva de muestras objetivo deben obtenerse preferiblemente en condiciones en las que se espere que la reserva de muestra de detección y la reserva de muestra objetivo tengan características de composición generalmente equivalentes, incluyendo en relación con el contenido de partículas objetivo, de modo que una determinación de un intervalo del factor de dilución optimizado utilizando la reserva de muestras de detección se traduzca razonablemente para la evaluación por citometría de flujo de muestras de fluido optimizadas preparadas utilizando la reserva de muestras objetivo. Por ejemplo, una reserva de muestra objetivo puede ser o prepararse a partir de un lote de muestra recolectado de material recolectado de un proceso de fabricación biológica en un día y la reserva de muestra de detección puede prepararse a partir de un lote de muestra recolectado de manera equivalente de material recolectado del mismo proceso de fabricación biológica en condiciones similares en un momento diferente, tal como a una hora diferente el mismo día o en un estado operativo equivalente. Sin embargo, como se ha indicado, en las implementaciones preferidas, la reserva de muestra objetivo y la reserva de muestra objetivo de detección son la misma reserva de muestra (por ejemplo, un único lote de muestras recolectado).

60 Los atributos particulares de partículas de las partículas objetivo pueden incluir una cualquiera o más de una de las propiedades de una partícula objetivo, por ejemplo, relacionadas con el tamaño, la composición, la morfología o las propiedades de conformación. En algunas implementaciones preferidas, un atributo particular de una partícula objetivo puede incluir una o más características biológicas particulares de interés que son susceptibles de identificación mediante el uso de una o más manchas fluorescentes. Dicha característica biológica puede incluir el contenido de proteínas y/o el contenido de ácidos nucleicos (por ejemplo, la presencia de material genómico) que generalmente es susceptible a la tinción no específica por tinciones fluorogénicas no específicas. Dicha característica biológica puede

incluir la presencia de un epítipo particular que puede identificarse mediante una actividad de unión antigénica específica, tal como la unión específica mediante una tinción de anticuerpo a una característica de partícula de interés, para su identificación mediante el uso de tinciones de anticuerpos fluorescentes. Las implementaciones pueden utilizar una única tinción fluorescente que identifique la presencia o ausencia de una sola característica de partícula o pueden utilizarse múltiples tinciones fluorescentes que identifiquen múltiples características de partículas. El uso de múltiples tinciones fluorescentes puede incluir la evaluación por citometría de flujo para identificar partículas objetivo con múltiples atributos de partícula mediante la identificación de respuestas fluorescentes coincidentes de dos o más de dos de dichas tinciones fluorescentes, o la presencia de un factor y la ausencia de otro factor mediante la identificación de una respuesta fluorescente de una mancha fluorescente que no coincide con una respuesta fluorescente de una segunda tinción fluorescente. Un ejemplo de una aplicación de este tipo incluye el uso de una mancha fluorogénica no específica para identificar la presencia generalmente de contenido de proteínas junto con otra mancha fluorogénica no específica para identificar la presencia generalmente de contenido de ácidos nucleicos. La identificación de casos coincidentes de respuestas fluorescentes de las dos manchas no específicas durante la citometría de flujo puede indicar la presencia de una partícula objetivo que incluye tanto el contenido de proteínas como el contenido de ácidos nucleicos, tal como puede ser el caso, por ejemplo, de un virión completo e intacto que incluye proteína de la envoltura o la cápside y el material genómico. Otro ejemplo de una aplicación de este tipo incluye el uso de una mancha de anticuerpos fluorescentes específica para el epítipo junto con una mancha fluorogénica no específica para el contenido de ácidos nucleicos. La mancha de anticuerpos fluorescentes puede ser específica para unirse con un epítipo en una envoltura viral, una cápside viral, un exosoma o una microvesícula, y la identificación de casos coincidentes de respuestas fluorescentes de dicha mancha de anticuerpos fluorescentes y una mancha de ácido nucleico no específica durante la citometría de flujo puede indicar la presencia de una partícula objetivo que incluye el epítipo y el material del genoma, tal como en el caso de un virión completo e intacto de tipo viral (por ejemplo, virus específico) representado por la presencia de dicho epítipo, mientras que la identificación de una respuesta fluorescente de una mancha fluorescente que no coincide con otra respuesta fluorescente de otra mancha fluorescente puede indicar la presencia de una partícula que tiene positivamente una característica de partícula y que no tiene la otra característica de partícula correspondiente a las diferentes manchas fluorescentes (por ejemplo, una partícula similar a un virus que tiene un epítipo viral y sin genoma). La información adicional sobre la tinción fluorescente y la detección de manchas con citometría de flujo que puede utilizarse con la presente descripción se describe en la patente de los EE.UU. n.º US 10.161.850 B2; US 10.031.061 B2; US 9.546.936 B2; US 9.903.803 B2, y en la solicitud de patente provisional de los EE.UU. n. 62/713.377. A diferencia de las muestras de fluido objetivo (por ejemplo, el detección de muestras de fluido objetivo y muestras de fluido objetivo optimizadas) que son objeto de investigación para las partículas objetivo, las muestras de fluido de control en blanco (por ejemplo, el detección de muestras de fluido de control en blanco y muestras de fluido de control en blanco optimizadas) son muestras de fluido preparadas intencionalmente para estar en ausencia de las partículas objetivo. Las muestras de fluido de control en blanco pueden proporcionarse para la evaluación por citometría de flujo para generar resultados de la citometría de flujo de control en blanco con recuentos de partículas de fondo que pueden utilizarse para corregir los resultados de la citometría de flujo de la evaluación por citometría de flujo de muestras de fluido objetivo que se están investigando para la presencia de partículas objetivo (por ejemplo, cribando muestras de fluido objetivo o muestras de fluido objetivo optimizadas). Por estar en ausencia de las partículas objetivo se entiende que la muestra de fluido está prácticamente exenta de las partículas objetivo para todos los fines prácticos en relación con la cuantificación por citometría de flujo, y no que una muestra objetivo en blanco de este tipo pueda incluir incluso una sola partícula objetivo de este tipo, aunque eso sería generalmente preferido. Preferiblemente, las muestras de fluido de control en blanco se corresponden estrechamente en composición con las muestras de fluido objetivo correspondientes, aparte de no incluir ninguna o ninguna cantidad significativa de las partículas objetivo. En algunas implementaciones más preferidas, las muestras de fluido de control en blanco se preparan utilizando una matriz de fluido de muestra en blanco de la reserva de muestras correspondiente para lo cual las muestras de fluido de control en blanco se utilizarán con fines de corrección. Por matriz de fluido se entiende la composición básica del medio fluido de una reserva de muestra, que junto con los líquidos reactivos añadidos forman el medio líquido de las muestras de fluido objetivo preparadas a partir de la reserva de muestras. Dichos líquidos reactivos añadidos pueden incluir, por ejemplo, un tampón de dilución de muestras usado para preparar muestras de fluido diluido en relación con la reserva de muestras, así como líquidos que pueden añadirse en relación con la tinción fluorescente de las muestras de fluido objetivo. Cada una de estas muestras de fluido de control en blanco debe hacerse preferiblemente con la misma mancha o manchas fluorescentes que las utilizadas en una muestra de fluido objetivo correspondiente y a las mismas concentraciones. Preferiblemente, se prepara al menos una, y más preferiblemente solo una, de dichas muestras de fluido de detección de control en blanco hechas con la matriz de fluido correspondiente para cada muestra de fluido objetivo de detección de un conjunto objetivo de detección. Preferiblemente, se prepara al menos una, y más preferiblemente solo una, muestra de fluido de control en blanco optimizada hecha con la matriz de fluido correspondiente para cada muestra de fluido objetivo optimizada de un conjunto objetivo optimizado.

Cuando la matriz de fluido de una reserva de muestras no está disponible para preparar una muestra de fluido de control en blanco correspondiente, entonces se puede utilizar una formulación líquida aproximada para preparar una muestra de fluido de control en blanco correspondiente. Por ejemplo, se puede preparar una muestra de fluido de control en blanco utilizando uno o más de los líquidos reactivos utilizados para preparar las muestras de fluido objetivo (por ejemplo, una mezcla de una solución tamponadora utilizada para la dilución de la reserva de muestra y los líquidos añadidos en relación con la tinción de la muestra). En dicho caso, una composición única de muestra de fluido de control en blanco hecha utilizando dicha formulación líquida reactiva y que contiene una mancha o manchas

fluorescentes en las mismas concentraciones que las muestras de fluido objetivo de detección, puede utilizarse como una muestra de fluido de control en blanco de detección correspondiente o una muestra de fluido de control en blanco optimizada correspondiente para un conjunto de control de detección o un conjunto de control optimizado, según sea el caso.

Se puede utilizar un citómetro de flujo para realizar una investigación por citometría de flujo de una muestra de fluido. La muestra de fluido puede incluir partículas objetivo con atributos de partícula particulares. La investigación por citometría de flujo de la muestra de fluido puede proporcionar un resultado de citometría de flujo para la muestra de fluido. El resultado de la citometría de flujo puede incluir una indicación de cuantificación de las partículas para la muestra de fluido. En un ejemplo, la indicación de cuantificación puede expresarse como una concentración de partículas, o partículas por unidad de volumen (por ejemplo, partículas/ml). En otro ejemplo, la indicación de cuantificación puede expresarse como un recuento de partículas (número de partículas) en un volumen estándar de muestra de fluido, a partir del cual se puede determinar la concentración de partículas. La muestra de fluido puede exponerse a una mancha o tinte que proporciona radiación de respuesta cuando se expone a la radiación de excitación de investigación que puede medirse mediante el sistema de detección de radiación del citómetro de flujo. Como se ha descrito anteriormente, y especialmente en solicitudes en las que las partículas que se van a medir son del tamaño de un virus, los instrumentos de citómetro de flujo son muy sensibles y la determinación precisa de los resultados del citómetro de flujo y con una precisión razonable puede resultar difícil. Específicamente, los resultados de la citometría de flujo pueden estar sujetos a errores para un número de fuentes, tal como se ha descrito anteriormente.

En consecuencia, al diseñar una investigación por citometría de flujo para lograr resultados adecuados y demostrablemente precisos, ha sido una práctica tradicional procesar muchas réplicas de muestras de fluido para calcular las medidas de la exactitud y/o precisión de los resultados de la citometría de flujo resultantes. Esto puede ser necesario para demostrar que los resultados de la citometría de flujo son lo suficientemente exactos y/o precisos para que se realice un análisis dado y que los resultados son estadísticamente sólidos. Por ejemplo, al menos cada una de las tres réplicas de un fluido de muestra objetivo puede someterse a citometría de flujo para obtener resultados para cada una de las tres réplicas. A su vez, los resultados de la citometría de flujo para las réplicas pueden procesarse utilizando técnicas de análisis de datos para proporcionar una medida de la exactitud y/o precisión de los resultados.

Además, en muchos diseños de investigación, un control también puede someterse a una investigación por citometría de flujo para proporcionar una exactitud mejorada de la investigación. Se puede proporcionar una muestra de fluido de control en blanco que reproduzca o imite en un grado razonable la composición del medio de fluido en el que se proporcionan las partículas objetivo de la muestra de fluido objetivo. Las muestras de fluido de control en blanco también pueden denominarse en la presente memoria simplemente muestras de fluido de control o muestras de fluido en blanco, por motivos de brevedad. Como una investigación por citometría de flujo de una muestra de fluido puede ser susceptible a eventos de detección falsos, la realización de una investigación por citometría de flujo de una muestra de fluido de control correspondiente puede permitir tener en cuenta y corregir los eventos de detección falsos en los resultados de la citometría de flujo resultantes para una muestra de fluido objetivo. Específicamente, los resultados de la citometría de flujo de la muestra de fluido de control pueden restarse de los resultados de la citometría de flujo de la muestra de fluido objetivo.

En una realización de un diseño de la investigación, se puede preparar una muestra de fluido de control en blanco utilizando la matriz de fluido de la reserva de muestras correspondiente, pero en ausencia de las partículas objetivo de la muestra de fluido objetivo. A este respecto, la muestra de fluido de control en blanco puede tener la misma composición que la matriz de muestra de fluido objetivo más reactivos añadidos, tales como la solución tamponadora de dilución y el líquido de tinción, y los tintes o manchas utilizados en la muestra de fluido objetivo. En un enfoque alternativo, se puede utilizar una solución tamponadora de muestra que incluya una mezcla de dichos líquidos reactivos que también se puede proporcionar con el tinte o la mancha de la muestra de fluido objetivo también en ausencia de las partículas objetivo. En cualquier sentido, se supone que cualquier partícula detectada en la muestra de fluido de control en blanco representa un error asociado con detecciones falsas, de modo que la sustracción de los resultados de la citometría de flujo para una muestra de fluido de control proporciona una medida corregida de la cuantificación real de las partículas en la muestra de fluido objetivo. Sin embargo, como es el caso de la muestra de fluido objetivo, una pluralidad de réplicas de la muestra de fluido de control se somete preferiblemente a una investigación por citometría de flujo para proporcionar resultados precisos para la muestra de fluido de control.

En consecuencia, puede apreciarse que someter cada una de las muchas muestras de fluido objetivo y muestras de fluido de control a una investigación por citometría de flujo puede presentar un número de desafíos. Inicialmente, para proporcionar un número deseado de réplicas tanto de muestras de fluido objetivo como de muestras de fluido de control, se necesita un suministro suficiente de reserva de muestras y reserva de control con la matriz de fluido correspondiente. En ciertos contextos donde suministros limitados de reservas están presentes o cuando una matriz de fluido en blanco de la reserva de muestra no está disponible, el diseño resultante de la investigación por citometría de flujo puede ser limitado en vista del suministro limitado de fluido de reserva. Además, el tiempo y los gastos necesarios para procesar cada uno de los fluidos de muestra objetivo y de control pueden ser prohibitivos. Además, dado que el instrumento de citometría de flujo puede ser sensible a un número de variables, algunas de las cuales pueden depender del funcionamiento o del tiempo, cuanto mayor sea el número de investigaciones durante un período de tiempo más largo, se introduce la susceptibilidad a un mayor error en relación con la investigación de cada muestra

de fluido. Es decir, en el contexto de muchas investigaciones de muestras de fluido, las condiciones asociadas con la primera investigación de muestras de fluido pueden ser diferentes a las condiciones de la última muestra de fluido, de modo que el cambio en las condiciones representa un error creciente en los resultados que se procesarán colectivamente. Como tal, la eficiencia de la investigación no solo proporciona el simple beneficio de reducir el tiempo y los gastos, sino que también logra resultados intrínsecamente más exactos al reducir el potencial de que se introduzcan errores al determinar los resultados de la citometría de flujo para un diseño de invitación dado.

Las Figuras 1A-1B muestran una realización de un citómetro 100 de flujo que incluye componentes de citometría de flujo contenidos dentro de un revestimiento 102 de protección que puede utilizarse para realizar una investigación por citometría de flujo en una muestra de fluido, para generar resultados de la citometría de flujo. Las muestras de fluido pueden introducirse en el citómetro 100 de flujo para la investigación por citometría de flujo a través de una entrada 104 de muestra. El citómetro 100 de flujo incluye almohadillas 106 de soporte sobre las que se soportan el peso del revestimiento 102 y el contenido dentro del revestimiento 102. De forma ventajosa, las almohadillas 106 de soporte pueden ser de un material que proporcione un aislamiento de vibraciones significativo al revestimiento 102 y al contenido dentro del revestimiento 102, frente a las vibraciones del entorno ambiental que pueden transmitirse a través de un estante, mesa u otra superficie en la que pueda situarse el citómetro 100 de flujo durante el uso. Las almohadillas 106 de soporte pueden, por lo tanto, proporcionar una estructura de aislamiento de vibraciones que proporcione una barrera de propagación de vibraciones al revestimiento 102 y al contenido dentro del revestimiento 102. Por ejemplo, las almohadillas 106 de soporte pueden ser de una composición polimérica que proporcione un efecto de descomposición por vibración. Los ejemplos de composiciones poliméricas incluyen composiciones poliméricas termoplásticas y termoestables.

Las Figuras 2A-2B muestran un ejemplo del montaje interno 180 del citómetro de flujo que puede estar dispuesto dentro del revestimiento 102 del citómetro 100 de flujo. El montaje interno 180 incluye un montaje de sistema óptico de flujo que incluye la plataforma 200 de soporte y un número de componentes ópticos de citometría de flujo soportados por la plataforma 200 de soporte, teniendo los componentes ópticos un posicionamiento relativo fijo configurado para realizar investigaciones de citometría de flujo de fluidos de muestra. El montaje del sistema óptico de citometría de flujo está soportado por una estructura de soporte que incluye tres miembros 202 de soporte rígidos y soportes de aislamiento de vibraciones (no mostrados en las Figuras 2A-2B) que están soportados por los miembros 202 de soporte, y sobre los que se soporta todo el peso de la plataforma 200 de soporte y los componentes soportados por la plataforma 200 de soporte durante las operaciones de investigación por citometría de flujo.

Los componentes ópticos de citometría de flujo soportados por la plataforma 200 de soporte incluyen una fuente de luz en forma de una unidad láser 206, una unidad 208 de células de flujo y un sistema de detección de luz que incluye una unidad 210 de espejo dicroico y dos unidades 212 de detección de luz, por ejemplo, que pueden incluir tubos fotomultiplicadores. Durante el funcionamiento de una investigación por citometría de flujo del fluido de muestra que fluye a través de un paso de flujo de investigación de una célula de flujo de la unidad 208 de células de flujo, la luz de la unidad láser 206 viaja a lo largo de un primer trayecto óptico 250 hasta la célula de flujo. El primer trayecto óptico 250 incluye una unidad 214 de espejo que incluye un espejo que puede orientarse que refleja la luz de la unidad láser 206 para dirigir esa luz a través de una lente 216 de enfoque para enfocar la luz en el área adyacente del paso de flujo de investigación dentro de la célula de flujo de la unidad 208 de célula de flujo. La orientación del espejo de la unidad 214 de espejo puede controlarse operando uno o ambos de un par de motores 270, 272 acoplados al espejo. La luz del paso de flujo de investigación de la célula de flujo se dirige a lo largo de un segundo trayecto óptico 260 desde la célula de flujo hasta la unidad 210 de espejo dicroico para su detección por los detectores 212 de luz. El segundo trayecto óptico 260 incluye una unidad 218 de lente de enfoque y una unidad 220 de lente espacial entre la unidad 208 de célula de flujo y la unidad 210 de espejo dicroico. Un espejo dicroico dentro de la unidad 210 de espejo dicroico divide la luz entre la luz que pasa a través del espejo dicroico y se dirige hacia el detector 212a de luz y la luz que es reflejada por el espejo dicroico y se dirige hacia el detector 212b de luz. Los filtros 222 de paso de banda pueden disponerse en los trayectos ópticos hacia los detectores 212 de luz para hacer pasar una luz estrecha que incluye una longitud de onda o una banda de longitudes de onda destinadas a ser detectadas por los detectores 212a, 212b de luz respectivos.

Durante el funcionamiento del citómetro 100 de flujo para realizar una investigación por citometría de flujo de una muestra de fluido, la muestra de fluido que se va a investigar puede introducirse en el citómetro de flujo a través de la entrada 104 de muestra. El fluido de muestra se conduce a una entrada (no mostrada en las Figuras 2A-2B) a la unidad 208 de célula de flujo. El fluido de muestra fluye a través del trayecto del fluido de investigación, también denominado en la presente memoria zona de investigación del citómetro de flujo en la unidad 208 de células de flujo y sale de la unidad 208 de células de flujo a través de una salida 226 de muestra. El fluido de muestra introducido en la unidad 208 de célula de flujo a través de la entrada 104 de fluido de muestra fluye a través de una sección transparente de la unidad 208 de célula de flujo donde se somete a la radiación de investigación de incidente (por ejemplo, luz de la unidad láser 206) y sale a través de la salida 226 de muestra. El paso de flujo de investigación pasa a través de la sección transparente. La sección transparente puede estar hecha, por ejemplo, de un material de cristal de cuarzo. Entre la entrada 104 de muestra del citómetro 100 de flujo y la entrada de la unidad 208 de células de flujo, la muestra de fluido pasa a través de un trayecto de fluido (no mostrado) que incluye un fluxímetro 232 donde la velocidad de flujo de la muestra de fluido puede medirse con fines de recolección de datos como parte de un mecanismo de control de retroalimentación para controlar la velocidad de flujo de la muestra de fluido a la unidad 208

de células de flujo. En la unidad 208 de célula de flujo, se introduce un fluido envolvente alrededor del flujo de muestra de fluido antes de que la muestra de fluido fluya a través de la sección transparente para su investigación. El fluido envolvente se introduce en la unidad 208 de célula de flujo a través de una entrada de fluido envolvente (no mostrada en las Figuras 2A-2B). Antes de la introducción del fluido envolvente en la unidad 208 de célula de flujo, el fluido envolvente pasa a través de un trayecto de fluido (no mostrado en las Figuras 2A-2B) que incluye un sensor 234 de flujo para monitorizar la velocidad de flujo del fluido envolvente a la unidad 208 de célula de flujo y para su uso como control de retroalimentación para controlar la velocidad de flujo del fluido envolvente a la unidad 208 de célula de flujo. Los sensores 232 y 234 de flujo están convenientemente soportados en la plataforma 200 de soporte.

Con referencia adicional a la Figura 3, se ilustra una representación esquemática de una realización de un sistema 300 de citometría de flujo. El sistema 300 de citometría de flujo puede incluir un citómetro 100 de flujo tal como el descrito anteriormente. El citómetro 100 de flujo puede funcionar para generar un resultado de citometría de flujo para una muestra de fluido sometida a una investigación por citometría de flujo utilizando el citómetro 100 de flujo. El resultado de la citometría de flujo generado por el citómetro 100 de flujo puede incluir una indicación de cuantificación de las partículas (por ejemplo, el recuento de partículas o la concentración de partículas) de una muestra de fluido dada. Los resultados de la citometría de flujo también pueden incluir otra información sobre la investigación por citometría de flujo, que incluye, aunque no de forma limitativa, un nombre de muestra con fines de identificación, un factor de dilución de una muestra, una etiqueta de fecha/hora correspondiente a la fecha/hora de la investigación por citometría de flujo, resultados individuales para los respectivos canales de investigación para la investigación multicanal (por ejemplo, incluyendo colorantes combinados que emplean diferentes atributos de partículas específicas para la investigación en los canales respectivos) y datos de detección de la radiación, como la línea de base del detector, el pico y las anchuras.

El citómetro 100 de flujo puede estar en comunicación operativa con una base de datos de resultados de la citometría 310 de flujo. El citómetro 100 de flujo puede proporcionar los resultados de la citometría de flujo para cada muestra de fluido sometida a una investigación por citometría de flujo por parte del citómetro 100 de flujo a la base de datos de resultados de la citometría 310 de flujo, donde los resultados del citómetro de flujo pueden almacenarse en la memoria del ordenador. La base de datos de resultados de la citometría 310 de flujo puede incluir cualquier estructura de base de datos apropiada para el almacenamiento de las entradas de la base de datos correspondientes a los resultados del citómetro de flujo para diferentes muestras de fluido respectivas sometidas a una investigación por citometría de flujo. Un ejemplo de implementación específico puede ser una base de datos SQL para almacenar los resultados de la citometría de flujo. La base de datos de los resultados de la citometría 310 de flujo puede ser local al sistema 300 de citometría de flujo (por ejemplo, en un dispositivo común con uno o más elementos del sistema 300 de citometría de flujo) o puede proporcionarse de forma remota. En el caso de que la base de datos de los resultados de la citometría 310 de flujo se proporcione de forma remota, el acceso a la base de datos de los resultados del citómetro 310 de flujo puede proporcionarse mediante una comunicación de red, tal como una red de área local o una red de área amplia, tal como internet.

El sistema 300 de citometría de flujo incluye además una memoria 320 del ordenador. La memoria 320 del ordenador puede tener almacenado en ella un módulo 360 de ensayo de detección y un módulo 370 de ensayo de títulos. El módulo 360 de ensayo de detección y el módulo 370 de ensayo de títulos pueden comprender instrucciones legibles por máquina almacenadas en la memoria 320 del ordenador. En este sentido, uno o más procesadores 330 pueden acceder al módulo 360 de ensayo de detección y al módulo 370 de ensayo de títulos en comunicación operativa con la memoria 320 del ordenador. El procesador 330 puede acceder y ejecutar el módulo 360 de ensayo de detección y el módulo 370 de ensayo de títulos para proporcionar la funcionalidad de los módulos, como se describe con mayor detalle a continuación. En otras realizaciones, el módulo 360 de ensayo de detección y/o el módulo 370 de ensayo de títulos pueden comprender cualquier *hardware*, *software*, *firmware* o combinaciones de los mismos apropiados para proporcionar la funcionalidad asociada con el módulo 360 de ensayo de detección y/o el módulo 370 de ensayo de títulos que se describen a continuación. Además, se pueden proporcionar múltiples procesadores 330 que puedan acceder y ejecutar de forma individual o colectiva el módulo 360 de ensayo de detección y el módulo 370 de ensayo de títulos para proporcionar la funcionalidad del sistema 300 de citometría de flujo que se describe con más detalle a continuación. En otras realizaciones, el módulo 360 de ensayo de detección y/o el módulo 370 de ensayo de títulos pueden comprender cualquier combinación adecuada de procesador y/o memoria, circuitos integrados específicos de la aplicación, matrices de puertas programables en campo u otro *hardware* o *software* informático que pueda ejecutarse para lograr la funcionalidad que se describe con más detalle a continuación.

El sistema 300 de citometría de flujo también puede incluir un dispositivo 340 de entrada y una pantalla 350, cada uno de los cuales está en comunicación operativa con el procesador 330. En este sentido, el procesador 330 puede recibir entradas de usuario desde el dispositivo 340 de entrada para su uso en interacción con o control del sistema 300 de citometría de flujo. Además, el procesador 330 puede configurar la pantalla 350 para presentar a un usuario de una manera perceptible por el usuario información sobre el funcionamiento del sistema 300 de citometría de flujo. La pantalla 350 y el dispositivo 340 de entrada pueden proporcionar de forma colectiva una interfaz 380 gráfica de usuario a través de la cual se puede facilitar la interacción entre un usuario y el sistema 300 de citometría de flujo. Por ejemplo, la interfaz 380 gráfica de usuario puede facilitar el control sobre el funcionamiento de uno o más de los citómetros 100 de flujo, el módulo 360 de ensayo de detección, el módulo 370 de ensayo de títulos y/o la base de datos de resultados de la citometría 310 de flujo. A continuación se explican un número de pantallas de interfaz gráfica de usuario que

pueden corresponder a la ejecución del módulo 360 de ensayo de detección y/o del módulo 370 de ensayo de títulos que pueden proporcionarse para la interactividad con el usuario utilizando la interfaz 380 gráfica de usuario mediante la presentación de las pantallas en la pantalla 350 y la recepción de las entradas correspondientes relacionadas con las pantallas del dispositivo 340 de entrada de usuario.

5 En general, el sistema 300 de citometría de flujo puede ejecutarse de modo que el módulo 360 de ensayo de detección esté operativo para acceder a los resultados de la citometría de flujo en la base de datos de los resultados del citómetro 310 de flujo para su uso en la determinación de un intervalo del factor de dilución optimizado. En relación con esto, se puede utilizar una reserva 390 de fluido de muestra de detección para preparar una pluralidad de muestras de fluido objetivo 392 de detección, cada una de las cuales puede someterse a una investigación por citometría de flujo mediante el citómetro 100 de flujo. Los resultados de la citometría de flujo para cada una de las muestras de fluido objetivo 392 de detección pueden almacenarse en la base de datos de resultados de la citometría 310 de flujo. Además, una o más muestras 398 de fluido de control en blanco de detección pueden prepararse y someterse a una investigación por citometría de flujo mediante el citómetro 100 de flujo de modo que los resultados de la citometría de flujo para una o más muestras 398 de fluido de control en blanco de detección puedan almacenarse en la base de datos de resultados de la citometría 100 de flujo. En consecuencia, el módulo 360 de ensayo de detección puede acceder a la base de datos de resultados de la citometría 310 de flujo para recuperar los resultados de la citometría de flujo para las muestras 392 de fluido objetivo de detección y/o para cribar la muestra 398 de fluido de control en blanco para su uso en la determinación del intervalo del factor de dilución optimizado, como se explicará con mayor detalle a continuación.

A su vez, se puede preparar una pluralidad de muestras 396 de fluido objetivo optimizadas a partir de una reserva 394 de fluido de muestra objetivo. Cada una de la pluralidad de muestras 396 de fluido objetivo optimizadas puede estar dentro del intervalo del factor de dilución optimizado (por ejemplo, según lo determinado por el módulo 360 de ensayo de detección) y, opcionalmente, todas pueden estar en el mismo factor de dilución dentro del intervalo de factor de dilución optimizado. En una realización, la reserva 390 de fluido de muestra de detección y la reserva 394 de fluido de muestra objetivo pueden ser la misma reserva de fluido. En realizaciones alternativas, la reserva 390 de fluido de muestra de detección puede ser una aproximación equivalente a la reserva 394 de fluido de muestra objetivo, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, la reserva 390 de fluido de la muestra de detección y la reserva 394 de fluido de muestra objetivo pueden tener las mismas partículas objetivo y pueden tener propiedades suficientemente similares (por ejemplo, incluyendo la composición del medio fluido y la concentración de partículas objetivo) de modo que los resultados de la citometría de flujo para las muestras 392 de fluido objetivo de detección modelen con exactitud el rendimiento del citómetro 100 de flujo en relación con las muestras 396 de fluido objetivo optimizadas. Un ejemplo contemplado puede estar relacionado con un entorno de procesamiento predecible en el que se va a analizar la reserva 394 de fluido de muestra objetivo. En un entorno de procesamiento tan predecible, la reserva 394 de fluido de muestra objetivo puede tener propiedades relativamente consistentes, de modo que un intervalo del factor de dilución optimizado determinado por el análisis de los resultados de la citometría de flujo para las muestras 392 de fluido objetivo de detección pueda aplicarse a un número de reservas 394 de fluido de muestra objetivo. Por ejemplo, un caso dado de una pluralidad de reservas 394 de fluido de muestra objetivo puede utilizarse como reserva 390 de fluido de muestra de detección, de modo que el análisis para determinar el intervalo del factor de dilución optimizado pueda aplicarse a la pluralidad restante de reservas 394 de fluido de muestra objetivo. Como tal, los resultados obtenidos utilizando los resultados de una reserva 390 de fluido de muestra de detección dada pueden utilizarse para otras reservas 394 de fluido de muestra objetivo preparadas en el entorno de procesamiento predecible durante un tiempo o número dado de instancias de reservas de fluido.

En cualquier sentido, el conjunto objetivo optimizado de muestras 396 de fluido objetivo optimizadas que están dentro del intervalo del factor de dilución optimizado puede someterse a una investigación por citometría de flujo mediante el citómetro 100 de flujo y los resultados de la citometría de flujo correspondientes para las muestras 396 de fluido objetivo optimizadas pueden analizarse mediante el módulo 370 de ensayo de títulos para proporcionar resultados de títulos de partículas para una reserva 394 de muestra objetivo. Además, también se puede preparar una muestra 399 de fluido de control en blanco optimizada y someterla a una investigación por citometría de flujo mediante el citómetro 100 de flujo. A su vez, los resultados de la citometría de flujo para la muestra 399 de fluido de control en blanco optimizada pueden almacenarse en la base de datos de resultados de la citometría 310 de flujo y pueden utilizarse por el módulo 370 de ensayo de títulos como control para el análisis a la hora de determinar los resultados de títulos de partículas.

La determinación del intervalo del factor de dilución optimizado y la posterior investigación por citometría de flujo de las muestras 396 de fluido objetivo optimizadas dentro del intervalo del factor de dilución optimizado pueden proporcionar una mayor exactitud y precisión de los resultados de títulos de partículas producidos por el módulo 370 de ensayo de títulos. Por ejemplo, puede ser necesario un número reducido de muestras de fluido objetivo de detección y/o muestras de fluido de control de detección para el funcionamiento del sistema 300 de citometría de flujo. A su vez, se puede reducir el error al reducir el número de investigaciones necesarias. Además, al determinar un intervalo del factor de dilución optimizado, se puede lograr la exactitud resultante de la investigación de las muestras 396 de fluido objetivo optimizadas, ya que el intervalo del factor de dilución optimizado puede ser particular para un citómetro 100 de flujo dado que investiga partículas objetivo particulares de una reserva 394 de fluido de muestra objetivo.

En relación con el intervalo optimizado del factor de dilución objetivo, la exactitud mejorada en este intervalo se puede lograr realizando una investigación por citometría de flujo de las muestras 396 de fluido objetivo optimizadas que están en un intervalo de dilución en el que un citómetro 100 de flujo demuestra una mayor exactitud. Un citómetro de flujo puede demostrar un intervalo de funcionamiento en relación con una concentración de partículas en una muestra de fluido. Es decir, un citómetro de flujo puede ser incapaz de producir resultados suficientemente exactos para las muestras de fluido que tienen concentraciones de partículas extremadamente altas y una concentración de partículas extremadamente baja, como se ha indicado anteriormente. En este sentido, el intervalo de concentraciones de partículas en una muestra de fluido sobre el que el citómetro de flujo puede producir resultados suficientemente exactos puede ser limitado. El intervalo de un instrumento puede tener un intervalo absoluto sobre el que funciona el citómetro 100 de flujo y un intervalo dinámico que depende del instrumento y de la muestra de fluido particular que se esté investigando. El intervalo dinámico de un instrumento puede referirse a un intervalo de concentraciones de partículas en el que las muestras de fluido con diversos factores de dilución demuestran resultados de la citometría de flujo lineales (en un régimen de análisis logarítmico como se explica más adelante). El análisis relativo a la determinación del intervalo dinámico de un citómetro de flujo se ilustra en relación con las Figuras 4-8. Este análisis puede denominarse análisis de detección, y dicho análisis puede realizarse mediante el módulo 360 de ensayo de detección, como se describe con mayor detalle a continuación.

La Figura 4 incluye una representación logarítmica 400 de los resultados de la citometría de flujo para un conjunto 406 objetivo de detección de muestras 406a, 406b, 406c y 406d de fluido objetivo de detección. La representación 400 también incluye los resultados de la citometría de flujo para un conjunto 408 de control de detección para cribar muestras 408a, 408b, 408c y 408d de fluido de control en blanco. El eje vertical de la representación 400 representa una escala logarítmica de los valores 402 de concentración de partículas y el eje horizontal representa una escala logarítmica de los valores 404 del factor de dilución de la muestra. A su vez, el conjunto 406 de detección objetivo y el conjunto 408 de control de detección se representan en relación con la concentración 402 de partículas y el factor 404 de dilución.

También se muestra en la representación 400 un límite de calificación del instrumento (IQL) 410. El IQL 410 representa la concentración mínima de partículas en una muestra de fluido para la que el citómetro 100 de flujo proporciona resultados suficientemente precisos y puede definir un límite inferior en las concentraciones de partículas en relación con el intervalo absoluto del instrumento de citometría de flujo. En consecuencia, cualquier resultado de citometría de flujo para una muestra 406 de fluido objetivo de detección que esté por debajo del IQL 410 puede ignorarse de cualquier análisis debido al hecho de que la muestra 406 de fluido objetivo de detección tiene una concentración por debajo del IQL 410 para el instrumento dado. Por ejemplo, en la Figura 4, el resultado de la citometría de flujo para la muestra 406d de fluido objetivo de detección está por debajo del IQL 410 y, por lo tanto, puede ignorarse en cualquier análisis de los datos de citometría de flujo.

Como se puede apreciar en la representación 400, la concentración 402 de partículas para cada muestra de fluido respectiva representada en la representación 400 se reduce con un factor 404 de dilución aumentado, como se esperaba teóricamente. Es decir, en teoría, la relación entre la concentración 402 de partículas y el factor 404 de dilución en una representación logarítmica debe ser lineal, reflejando una reducción proporcional en la concentración de partículas en las muestras de fluido a medida que las muestras se diluyen cada vez más. Sin embargo, debido a las limitaciones y errores de los instrumentos, es posible que los resultados prácticos de la citometría de flujo no cumplan con la relación lineal del escenario teórico idealizado. Concretamente, las muestras de fluido con altas concentraciones de partículas pueden tener recuentos de partículas inferiores a los notificados y las muestras de fluidos con concentraciones de partículas bajas pueden tener recuentos de partículas superiores a los notificados, lo que resulta en un “aplanamiento” de los datos en concentraciones de partículas altas y bajas. A su vez, la calidad de la linealidad de los resultados de la citometría de flujo obtenidos sobre una pluralidad de factores de dilución puede evaluarse como se describirá con mayor detalle a continuación. Como se apreciará, la relación logarítmica de la Figura 4 podría representarse de manera equivalente en una representación lineal transformada de valores logarítmicos de concentración de partículas frente a valores logarítmicos del factor de dilución.

Con referencia adicional a la Figura 5, se proporciona una representación 500 en dicha forma de transformación lineal que tiene un eje vertical representativo de una escala lineal del valor logarítmico de la concentración 502 de partículas y un eje horizontal representativo de una escala lineal del valor logarítmico del factor 504 de dilución. El gráfico 500 muestra una pluralidad de indicaciones 506 de cuantificación corregidas para una pluralidad de muestras de fluido objetivo de detección. Como se ha descrito anteriormente, las indicaciones 506 de cuantificación corregidas pueden corresponder a un resultado de citometría de flujo para una muestra de fluido objetivo de detección correspondiente por un resultado de citometría de flujo de una muestra de fluido de control en blanco de detección correspondiente. Una vez representadas las indicaciones 506 de cuantificación corregidas, se puede calcular un ajuste de las indicaciones 506 de cuantificación corregidas. El ajuste puede proporcionar una medida cuantitativa o una caracterización de las indicaciones 506 de cuantificación corregidas. Por ejemplo, el ajuste puede proporcionar parámetros de calidad de la dilución que pueden analizarse para determinar si las indicaciones 506 de cuantificación corregidas representan un resultado suficientemente lineal, lo que indica que los resultados de la citometría de flujo de las muestras de fluido objetivo de detección tenían una concentración que estaba dentro del intervalo dinámico del citómetro 100 de flujo en el que la exactitud aumenta.

Con referencia adicional a la Figura 6, se puede calcular un ajuste para las indicaciones 506 de cuantificación corregidas. Por ejemplo, se puede calcular una regresión lineal en función de las indicaciones 506 de cuantificación corregidas de tal modo que se pueda generar una línea 508 de tendencia resultante. La línea 508 de tendencia resultante puede proporcionar la caracterización cuantitativa de uno o más parámetros de calidad de la dilución para su uso en la evaluación de si las indicaciones 506 de cuantificación corregidas para las que se calcula el ajuste están dentro de un intervalo dinámico del citómetro 100 de flujo. Es decir, la línea 508 de tendencia puede proporcionar un medio para la evaluación de las indicaciones 506a, 506b y 506c de cuantificación corregidas para determinar si las indicaciones 506 de cuantificación corregidas en el gráfico 500 demuestran un nivel de comportamiento anticipado correspondiente a las características de los resultados dentro de un intervalo dinámico del citómetro 100 de flujo correspondiente a una mayor exactitud del citómetro 100 de flujo. Una caracterización cuantitativa del ajuste que proporciona un parámetro de calidad de dilución puede ser una pendiente de la línea 508 de tendencia con respecto a dicha representación de transformación lineal, como se muestra para la representación 500. En este escenario, el rendimiento idealizado (es decir, todas las indicaciones 506 de cuantificación corregidas que entran dentro del intervalo dinámico lineal del citómetro 100 de flujo) puede representarse como un valor de pendiente de -1. Dicha ecuación lineal puede adoptar la forma de  $y = mx + b$ , en donde  $m$  es la pendiente y  $b$  es la intercepción del eje vertical a un valor logarítmico de cero para el factor de dilución. En este sentido, se puede proporcionar una ecuación lineal que caracteriza la línea 508 de tendencia en la representación 500, como se ilustra en la Figura 6. La ecuación lineal proporciona un valor 514 de pendiente que puede evaluarse para determinar si las indicaciones 506 de cuantificación corregidas entran dentro de un intervalo dinámico suficientemente lineal (es decir, lineal en términos de la representación 500 de valores logarítmicos de la Figura 5) del citómetro 100 de flujo. Es decir, el ajuste de las indicaciones 506 de cuantificación corregidas puede compararse con los parámetros de calidad de dilución aceptables, al menos en parte, mediante la comparación de un valor 514 de pendiente computado de la línea 508 de tendencia en relación con el valor de pendiente idealizado de -1. Específicamente, un intervalo de valores de pendiente aceptables puede ser definido o definible por un usuario. En consecuencia, un valor 514 de pendiente que esté dentro del intervalo de valores de pendiente aceptables puede indicar un parámetro de calidad de dilución aceptable para las indicaciones 506 de cuantificación corregidas, lo que indica que las indicaciones de cuantificación corregidas utilizadas para generar el ajuste están dentro del intervalo dinámico del instrumento. Sin embargo, un valor 514 de pendiente calculado que está fuera del intervalo de valores de pendiente aceptables puede dar como resultado una notificación de ajuste de dilución, como se describe con mayor detalle a continuación.

Además, también se puede proporcionar un coeficiente de determinación (o valor  $R^2$ ) para la línea 508 de tendencia en relación con los puntos representados de las indicaciones de cuantificación corregidas. El valor  $R^2$  también puede comprender un parámetro de calidad de dilución que puede utilizarse para analizar la línea 508 de tendencia. El valor  $R^2$  puede proporcionar una caracterización cuantitativa de la cantidad de divergencia de las indicaciones 506 cuantitativas corregidas con respecto a la línea 508 de tendencia. Dicho de otro modo, el valor  $R^2$  puede proporcionar una indicación de cómo de bien el ajuste describe las indicaciones 506 cuantitativas corregidas. Cuanto más cerca esté  $R^2$  de 1, mejor será el ajuste de la línea 508 de tendencia a los factores 506 de dilución corregidos representados. En este sentido, el valor  $R^2$  también puede proporcionar un parámetro de calidad de dilución que puede utilizarse para evaluar la aceptabilidad del ajuste. Es decir, se puede proporcionar un intervalo de valores de  $R^2$  aceptables. A su vez, un valor de  $R^2$  computado que esté dentro del intervalo de valores de  $R^2$  aceptables puede indicar un parámetro de calidad de dilución aceptable para las indicaciones 506 de cuantificación corregidas, lo que indica que las indicaciones de cuantificación corregidas utilizadas para generar el ajuste están dentro del intervalo dinámico del instrumento. Sin embargo, un valor de  $R^2$  calculado que esté fuera del intervalo de valores de  $R^2$  aceptables puede resultar en una notificación de ajuste como se describe con mayor detalle a continuación.

En una relación adicional con la evaluación de la aceptabilidad de un ajuste calculado para las indicaciones 506 de cuantificación corregidas, la Figura 7 ilustra un gráfico 600 de otro conjunto de ejemplo de indicaciones 606a, 606b, 606c y 606d de cuantificación corregidas. De nuevo, se ha calculado la línea 508 de tendencia correspondiente a un ajuste de las indicaciones 606 de cuantificación corregidas. Como puede apreciarse, el valor 514 de pendiente calculado para la línea 508 de tendencia es de aproximadamente -0,7, lo que indica una desviación del valor idealizado de -1. En el escenario de ejemplo presentado en la Figura 7, se considera que este valor 514 de pendiente está fuera del intervalo de valores de pendiente aceptables, lo que da como resultado una notificación de ajuste, ya que el parámetro de calidad de dilución de la pendiente no es un parámetro de calidad de dilución aceptable para los fines de este ejemplo. Además, el valor  $R^2$  se reduce con respecto a la representación idealizada 500 en la que el valor de  $R^2$  estaba cerca de un valor idealizado de 1. En consecuencia, el valor de  $R^2$  en este escenario también está fuera del intervalo de valores de  $R^2$  aceptables, de modo que el valor de  $R^2$  también da como resultado una notificación de ajuste.

A su vez, los parámetros de calidad de dilución para el ajuste para las indicaciones 606a, 606b, 606c y 606d de cuantificación corregidas que no tienen parámetros de calidad de dilución aceptables pueden indicar que al menos uno de los resultados de la citometría de flujo correspondientes a las indicaciones 600 de cuantificación corregidas está fuera del intervalo dinámico del citómetro 100 de flujo, de modo que los resultados no demuestran una linealidad suficiente. Específicamente, el ajuste de las indicaciones 606 de cuantificación corregidas puede indicar que la exactitud de al menos un resultado del citómetro de flujo correspondiente se ve comprometida debido a un error del instrumento en los resultados debido a que una de las muestras de fluido se encuentra en una concentración fuera

del intervalo dinámico del citómetro 100 de flujo para las características de la muestra de fluido bajo investigación. Como puede apreciarse, es probable que dicho error se produzca para un resultado de citometría de flujo (y, a su vez, una indicación 606 de cuantificación corregida correspondiente) correspondiente a la dilución máxima o la dilución mínima en el conjunto de datos proporcionado, ya que es muy probable que estos valores estén en el margen de o fuera del intervalo dinámico del instrumento. En la representación 600, esto corresponde a la indicación 606a de cuantificación corregida que representa la dilución mínima del conjunto de datos o a la indicación 606d de cuantificación corregida que representa la dilución máxima del conjunto de datos. En consecuencia, una o ambas indicaciones 606a de cuantificación corregidas correspondientes a la dilución máxima y/o la indicación 606d de cuantificación corregida correspondiente a una dilución mínima del conjunto de datos pueden eliminarse del cálculo de la línea 508 de tendencia para determinar si los parámetros de calidad de dilución resultantes para las indicaciones 606 de cuantificación corregidas restantes corresponden a parámetros de calidad de dilución aceptables.

Con referencia adicional a la Figura 8, se presenta una representación 700 en la que la indicación 606a de cuantificación corregida se ha eliminado del cálculo del ajuste (por ejemplo, como un valor atípico), de modo que se proporciona un cálculo actualizado de la línea 508 de tendencia. Como puede apreciarse, después de eliminar la indicación 606a de cuantificación corregida, el valor 514 de pendiente para la línea 508 de tendencia vuelve a casi el ideal y el valor  $R^2$  512 también aumenta hasta casi el ideal. En este escenario, tanto el valor 514 de pendiente como el valor  $R^2$  512 pueden corresponder a parámetros de calidad de dilución aceptables, de modo que el ajuste de las indicaciones 606b, 606c y 606d de cuantificación corregidas restantes pueda confirmarse (o validarse con fines de análisis de datos) por representar un resultado suficientemente lineal indicativo de que las indicaciones de cuantificación corregidas están aceptablemente dentro del intervalo dinámico del instrumento de citometría de flujo.

Si bien lo anterior contempla la evaluación de las indicaciones 606 de cuantificación corregidas para determinar si las indicaciones 606 de cuantificación corregidas están dentro del intervalo dinámico de un instrumento, la determinación de un intervalo de dilución optimizado para una reserva de muestras de detección dada puede estar relacionada con un aislamiento adicional de un intervalo de concentraciones en el que el citómetro 100 de flujo demuestra una mayor exactitud. Es decir, un citómetro de flujo puede demostrar un intervalo absoluto en el que se pueden generar resultados, lo que puede no dar como resultado una relación lineal de los resultados de la citometría de flujo en la totalidad del intervalo absoluto (es decir, puede haber error para las muestras en el intervalo absoluto en diluciones altas y/o bajas). El citómetro de flujo también puede tener un intervalo dinámico para un conjunto de muestras dado en el que los resultados (o los resultados corregidos) demuestran una linealidad suficiente como para estar dentro del intervalo dinámico del instrumento como se ha determinado anteriormente. Además, un citómetro de flujo generalmente puede proporcionar resultados más exactos dentro de una banda de rendimiento óptima definida en relación con la concentración de partículas en una muestra de fluido que se está investigando. Dicha banda de rendimiento óptimo puede representar un subintervalo de rendimiento más alto dentro del intervalo dinámico. En vista de la extrema sensibilidad de los citómetros de flujo, la realización de investigaciones por citometría de flujo con muestras de fluido que tienen una concentración dentro de la banda de rendimiento óptima puede proporcionar resultados aún más precisos y exactos para un citómetro de flujo dado que investigue una reserva de muestras objetivo dada.

Por lo tanto, con referencia de nuevo a la Figura 8, la línea 508 de tendencia para las indicaciones 606 de cuantificación corregidas, en la que la línea 508 de tendencia refleja una linealidad suficiente en los datos de modo que las indicaciones 606 de cuantificación corregidas estén dentro del intervalo dinámico del instrumento, puede utilizarse además para determinar un intervalo de factores de dilución optimizado para la reserva de muestras de detección. Específicamente, se pueden definir un límite 702 de concentración de rendimiento inferior y un límite 704 de concentración de rendimiento superior para un citómetro 100 de flujo, como se refleja en la representación 700. El límite 702 de concentración de rendimiento inferior y el límite 704 de concentración de rendimiento superior pueden determinarse empíricamente para un citómetro 100 de flujo dado o pueden ser definibles por un usuario. En cualquier sentido, el límite 702 de concentración de rendimiento inferior y el límite 704 de concentración de rendimiento superior pueden definir un subintervalo de concentración dentro del intervalo dinámico sobre el que el rendimiento del citómetro 100 de flujo demuestra una mayor precisión. A su vez, el límite 702 de concentración de rendimiento inferior se puede utilizar para determinar el punto en el que la línea 508 de tendencia para los datos en el intervalo dinámico del instrumento corresponde al límite 702 de concentración de rendimiento inferior. El factor de dilución en el que el límite 702 de concentración de rendimiento inferior interseca la línea 508 de tendencia para los datos en el intervalo dinámico del instrumento puede definir un límite del factor 706 de dilución optimizado superior de un intervalo del factor de dilución optimizado. Del mismo modo, un factor de dilución en el que el límite 704 de concentración de rendimiento superior interseca la línea 508 de tendencia puede definir un límite 708 de factor de dilución optimizado inferior del intervalo del factor de dilución optimizado. Como tal, el intervalo del factor de dilución optimizado puede corresponder al intervalo entre el límite 708 de factor de dilución optimizado inferior y el límite del factor 706 de dilución optimizado superior, según lo determinado mediante el análisis del límite 704 de concentración de rendimiento superior y el límite 702 de concentración de bajo rendimiento en relación con la línea 508 de tendencia para los datos que se determina que están en el intervalo dinámico del instrumento.

A su vez, y con referencia también a la Figura 3, el análisis anterior se puede utilizar para determinar un intervalo del factor de dilución optimizado para una reserva 390 de fluido de muestra de detección dada. Dicho análisis puede ser realizado por el módulo 360 de ensayo de detección del sistema 300 de citometría de flujo junto con las pantallas de

la interfaz gráfica de usuario representadas en las Figuras 9-16. La interfaz 380 gráfica de usuario puede incluir un número de pantallas que pueden presentarse a un usuario en general en relación con: la selección de los resultados de la citometría de flujo o su uso por parte del módulo 360 de ensayo de detección para el análisis de detección o su uso por parte del módulo 370 de ensayo de títulos para el análisis de títulos en una pantalla de listado 800 de resultados que se muestra en las Figuras 9 a 10; control e interacción con el módulo 360 de ensayo de detección en relación con el análisis de detección en una pantalla 900 de ensayo de detección mostrada en las Figuras 11-14; y el control y la interacción con el módulo 370 de ensayo de títulos en relación con el análisis de títulos en una pantalla 1000 de ensayo de títulos que se muestra en las Figuras 15-16. Además, cada pantalla de la interfaz 380 gráfica de usuario puede mostrar una porción 820 de selección de pantalla. La porción 820 de selección de pantalla puede proporcionar pestañas correspondientes a diferentes pantallas respectivas que pueden utilizarse para seleccionar una pantalla dada de la interfaz 380 gráfica de usuario. En este sentido, la barra 820 de selección de pantalla puede incluir una pestaña 822 de análisis, una pestaña 824 de resultados, una pestaña 826 de selección y una pestaña 828 de títulos. La pestaña 822 de análisis puede ser manipulada por el usuario en relación con el funcionamiento del citómetro de flujo durante una investigación por citometría de flujo para monitorizar las operaciones del citómetro 100 de flujo y no se explicará en detalle en la presente memoria. La interfaz 380 gráfica de usuario también puede incluir un panel 810 de control de instrumentos que puede incluir diversas interfaces para su uso en el control del funcionamiento del citómetro 100 de flujo.

La Figura 9 representa una pantalla de listado 800 de resultados de la interfaz 380 gráfica de usuario. La pantalla de listado 800 de resultados puede incluir un listado 850 de resultados que incluye un listado de resultados de la citometría de flujo de la base de datos de resultados de la citometría 310 de flujo. Como se ha descrito anteriormente, se puede preparar una muestra 392 de fluido objetivo de detección en cada una de las múltiples diluciones de la reserva 390 de fluido de muestra de detección. Además, se pueden añadir tintes o manchas a cada muestra 392 de fluido objetivo de detección que se pueden utilizar en la detección de partículas objetivo que tienen atributos de partícula particulares. En un ejemplo, la pluralidad de muestras 392 de fluido objetivo de detección puede comprender una serie de diluciones de la reserva 390 de fluido de muestra de detección que se diluye hasta una pluralidad de factores de dilución (por ejemplo, una pluralidad de factores de dilución diferentes). En una realización, la serie de diluciones puede incluir una serie de diluciones diez veces mayor de la reserva 390 de fluido de muestra de detección, de modo que se proporcione una muestra 392 de fluido objetivo de detección en diluciones que aumentan en un factor frecuente (por ejemplo, 10:1, 100:1, 1000:1 etc.). En al menos una realización, se puede preparar una única muestra 392 de fluido objetivo de detección para cada uno de la pluralidad de factores de dilución. Es decir, en al menos una realización, es posible que no sea necesario someter a una investigación por citometría de flujo múltiples réplicas de una muestra 392 de fluido objetivo de detección a una dilución dada, lo que reduce el número de muestras de fluido necesarias que deben investigarse y proporciona los beneficios indicados y explicados anteriormente. Los resultados de la citometría de flujo para la pluralidad de muestras 392 de fluido objetivo de detección pueden proporcionarse y guardarse en la base de datos de los resultados del citómetro 310 de flujo de modo que se reflejen en el listado 850 de resultados. Como puede apreciarse en la Figura 9, la selección de un resultado dado del listado 850 de resultados puede ampliar el resultado dado para proporcionar información adicional y/u opciones para el resultado dado. Por ejemplo, se puede proporcionar una opción para permitir a un usuario comentar el resultado o proporcionar una firma electrónica.

Además, se pueden preparar una o más muestras 398 de fluido de control en blanco de detección y someterlas a una investigación por citometría de flujo utilizando el citómetro 100 de flujo. Una o más muestras 398 de fluido de control en blanco de detección pueden incluir una o más muestras de fluido que corresponden a la pluralidad de muestras 392 de fluido objetivo de detección. Como tal, una o más muestras 398 de fluido de control en blanco de detección pueden tener propiedades similares a la pluralidad de muestras de fluido objetivo de detección, pero pueden estar sustancial o totalmente exentas de las partículas objetivo de interés que se van a investigar. Los resultados de la citometría de flujo generados para la muestra 398 de fluido de control en blanco de detección pueden reflejar el ruido de fondo detectado por el citómetro 100 de flujo en lugar de los recuentos de partículas reales, de modo que la muestra 398 de fluido de control en blanco de detección pueda utilizarse para preparar indicaciones de cuantificación corregidas como se ha descrito anteriormente. En una realización, una o más muestras 398 de fluido de control en blanco de detección pueden ser una matriz de muestras en blanco del mismo tipo que la pluralidad de muestras 392 de fluido objetivo de detección en ausencia de que la partícula objetivo de interés esté siendo investigada en la investigación por citometría de flujo, pero que por lo demás tenga propiedades y preparación similares, como la inclusión del tinte o mancha utilizado en la investigación por citometría de flujo. Se puede proporcionar una pluralidad de muestras 398 de fluido de control en blanco de detección en las diluciones correspondientes a cada una de las múltiples diluciones proporcionadas en la pluralidad de muestras 392 de fluido objetivo de detección. En este sentido, la correspondencia entre la pluralidad de muestras 392 de fluido objetivo de detección y muestras 398 de fluido de control en blanco de detección puede estar relacionada con las diluciones comunes de cada muestra. En otra realización, las una o más muestras 398 de fluido de control en blanco de detección pueden incluir solución tamponadora y/u otros fluidos reactivos en lugar del fluido de la matriz de reserva de la muestra en blanco (por ejemplo, en el caso de que el fluido de la matriz de la muestra de la reserva en blanco no esté disponible). En este sentido, es posible que no se proporcionen las diluciones correspondientes y una sola muestra 398 de fluido de control en blanco de detección puede someterse a una investigación por citometría de flujo para determinar el ruido de fondo asociado con la solución tamponadora y/o cualquier tinte o mancha utilizado en el ensayo. Tras la investigación por citometría de flujo de una o más muestras 398 de fluido de control en blanco de detección, los resultados del citómetro de flujo para las muestras

398 de fluido de control en blanco de detección pueden proporcionarse a la base de datos de los resultados del citómetro 310 de flujo y pueden reflejarse en el listado 850 de resultados.

5 El listado 850 de resultados puede incluir un número de columnas de datos relacionadas con los parámetros de datos de los resultados de la citometría de flujo proporcionados como entradas de fila en el listado 850 de resultados. Por ejemplo, las columnas pueden reflejar cualquier información para un resultado de citometría de flujo incluido en la base de datos de resultados de la citometría de flujo como se ha descrito anteriormente, incluyendo, aunque no de forma limitativa, una columna 852 de nombre de la muestra, una columna 854 del factor de dilución, una columna 856 del resultado del recuento de las partículas, una columna 858 del resultado del título (que muestra la concentración de partículas), una columna 860 de la fecha/hora de adquisición, una columna del identificador de instrumentos (no se muestra), una columna del operador (no se muestra) y otras columnas de datos que pueden estar relacionadas con la investigación por citometría de flujo, como los recuentos individuales de los canales de detección y los datos de detección de la radiación, tal como la línea de base del detector, los picos y las anchuras. El listado 850 de resultados puede clasificarse según cualquiera de las columnas presentadas en el listado 850 de resultados. Además, se puede proporcionar una funcionalidad de clasificación adicional por medio de una opción de clasificación por el usuario 872, una opción de clasificación por instrumentos 874 o una opción de clasificación por fecha 876. Además, se pueden proporcionar opciones para ocultar ciertos tipos de resultados de la citometría de flujo.

20 Con referencia adicional a la Figura 10, un usuario puede seleccionar los resultados de la citometría de flujo del listado 850 de resultados para designar los resultados de la citometría de flujo específicos para su utilización en el análisis de detección realizado por el módulo 360 de ensayo de detección o en el análisis de títulos realizado por el módulo 370 de ensayo de títulos. En relación con la selección de los resultados de la citometría de flujo para su uso por parte del módulo 360 de ensayo de detección, un usuario puede seleccionar una o más entradas de resultados de la citometría de flujo del listado 850 de resultados navegando hasta un menú 878 de designación de resultados que incluye un submenú 880 de selección de detección que permite la selección 882 de una selección de conjunto de control de detección o una selección 884 de conjunto objetivo de detección. Es decir, los resultados seleccionados del listado 850 de resultados pueden ser seleccionados por el usuario como pertenecientes a un conjunto de control de detección mediante la selección de los resultados de la citometría de flujo y la selección de la selección 882 del conjunto de control de detección. De manera similar, los resultados seleccionados del listado 850 de resultados pueden ser seleccionados por el usuario como pertenecientes a un conjunto objetivo de detección mediante la selección de los resultados de la citometría de flujo y la selección de la selección 884 del conjunto objetivo de detección.

35 Con referencia adicional a la Figura 11, se representa una pantalla 900 de ensayo de detección que se puede presentar al usuario al seleccionar la pestaña 826 de detección de la barra 820 de selección de pantalla. La pantalla 900 de ensayo de detección puede incluir un listado 902 de conjuntos de control de detección que se rellena con el conjunto 906 de control de detección seleccionado por el usuario utilizando la selección 884 de conjuntos de control de detección. La pantalla 900 de ensayo de detección puede incluir además un listado 904 de conjuntos objetivo de detección que está relleno de resultados de la citometría de flujo que comprenden el conjunto 908 objetivo de detección seleccionado utilizando la selección 884 de conjuntos objetivo de detección del listado 850 de resultados en la pantalla 800 de resultados.

40 Tras la selección del conjunto 906 de control de detección y el conjunto 908 objetivo de detección, se pueden realizar una o más determinaciones o cálculos descritos anteriormente en relación con la determinación del intervalo dinámico del instrumento en relación con el conjunto 908 objetivo de detección seleccionado utilizando el conjunto 906 de control de detección y el conjunto 908 objetivo de detección. Dichos cálculos se pueden realizar automáticamente al rellenar el conjunto 904 objetivo de detección y el conjunto 906 de control de detección o pueden requerir que el usuario inicie los cálculos seleccionando el botón 910 de cálculo. En este sentido, la Figura 11 representa un ejemplo de la pantalla 900 del ensayo de detección en el que se han seleccionado el conjunto 906 de control de detección y el conjunto 908 objetivo de detección, pero aún no se han calculado los cálculos del intervalo del factor de dilución optimizado. Con referencia adicional a la Figura 12, se representa una pantalla 900 de ensayo de detección en la que se han realizado los cálculos del intervalo del factor de dilución optimizados (por ejemplo, automáticamente o mediante la selección del botón 910 de cálculo). La selección del cálculo automático o del cálculo iniciado por el usuario se puede configurar en un menú de ajustes de la interfaz 380 gráfica de usuario.

55 Continuando con la referencia a la Figura 12, en relación con los cálculos y análisis descritos anteriormente para determinar el intervalo del factor de dilución óptimo, la pantalla 900 de ensayo de detección también puede incluir un área 916 de representación en la que se muestran al usuario las indicaciones de cuantificación corregidas basadas en el conjunto 908 objetivo de detección y el conjunto 906 de control de detección. Es decir, el módulo 360 de ensayo de detección puede estar operativo para calcular una indicación de cuantificación corregida de partículas para cada una de las muestras de fluido objetivo de detección del conjunto 908 objetivo de detección en función de las correspondientes del conjunto 906 de control de detección. La indicación de cuantificación corregida también puede mostrarse para cada uno de los conjuntos 908 objetivo de detección en una columna 912 de cuantificación corregida de partículas en el listado 904 de conjuntos objetivo de detección.

65 Además, el módulo 360 de ensayo de detección puede determinar si el conjunto 906 de control de detección seleccionado incluye los resultados correspondientes al conjunto 908 objetivo de detección. Es decir, el módulo 360

de ensayo de detección puede comprobar que se proporciona una muestra de control en una dilución correspondiente a cada dilución de las muestras de fluido objetivo del conjunto 908 objetivo de detección. Si no hay correspondencia (por ejemplo, se selecciona una muestra de fluido de control de detección para la que no hay una muestra de fluido objetivo de detección correspondiente o se seleccionan muestras de fluido objetivo de detección para las que no hay una muestra de fluido de control de detección), el módulo 360 de ensayo de detección puede generar una notificación de correspondencia, que puede activar un indicador 924 de notificación de datos que se mostrará como se muestra en la Figura 13. Es decir, el indicador 924 de notificación de datos puede proporcionarse en el caso de que esté presente cualquier notificación de datos en relación con el funcionamiento del módulo 360 de ensayo de detección. A su vez, la selección del indicador 924 de notificación de datos puede dar como resultado la visualización de un listado detallado de notificaciones de datos 926, tal como se muestra en la Figura 14. El listado 926 detallado de notificaciones de datos puede incluir un listado detallado de todas las notificaciones de datos presentes, tal como la notificación de correspondencia explicada anteriormente o cualquier otra notificación de datos descrita en la siguiente descripción. La notificación de correspondencia puede proporcionarse como una notificación cautelar o advertencia proporcionada al usuario indicando la falta de correspondencia. Esto puede permitir al usuario abordar la falta de correspondencia mediante el repaso y/o revisión del conjunto 906 de control de detección seleccionado y/o del conjunto 908 objetivo de detección. Por ejemplo, una muestra de fluido de control de detección en el conjunto 906 de control de detección o una muestra de fluido objetivo de detección en el conjunto 908 objetivo de detección puede resaltarse (por ejemplo, mediante un color de fondo desplazado o un cambio en el color de fuente, tamaño u otro formato) en el listado 902 de conjuntos de control de detección o en el listado 904 de conjuntos objetivo, lo que indica que no se proporciona ningún resultado correspondiente. La notificación de datos puede ser informativa o puede requerir una acción por parte del usuario para abordar el problema que causa la notificación antes de determinar un intervalo del factor de dilución óptimo. Por ejemplo, se le puede solicitar al usuario que vuelva al listado 850 de resultados y seleccione un valor correspondiente apropiado que falte. En el caso de que la notificación de correspondencia sea cautelar, un usuario también puede optar por continuar sin abordar el problema que causa la notificación. Alternativamente, la notificación de correspondencia puede provocar un fallo en el módulo 360 de ensayo de detección que impida un cálculo adicional del intervalo del factor de dilución optimizado hasta que y a menos que la condición que crea la notificación de correspondencia sea resuelta por el usuario.

En ciertas realizaciones, como se ha descrito anteriormente, se pueden hacer una o más muestras de fluido de control en blanco de detección utilizando un tampón de dilución de muestras y/u otros líquidos reactivos y no utilizando una matriz de reserva de la muestra. En este caso, la correspondencia directa entre el conjunto 906 de control de detección y el conjunto 908 objetivo de detección puede no ser necesaria, ya que la muestra de fluido de control en blanco de detección puede no tener una dilución correspondiente a la pluralidad de muestras de fluido objetivo de detección. En este sentido, el usuario puede seleccionar una selección 914 de anulación de correspondencia de control que anule cualquier notificación de correspondencia y haga que el módulo 360 de ensayo de detección utilice los resultados de la muestra de control dados del conjunto de control de detección 908 para su uso en la corrección de cada una de la pluralidad de muestras de fluido objetivo de detección del conjunto 908 objetivo de detección.

El módulo 360 de ensayo de detección también puede calcular las indicaciones 912 de cuantificación corregidas para cada uno del conjunto 908 objetivo de detección. Esto puede incluir la sustracción de los resultados de citometría de flujo del conjunto 906 de control de detección de los correspondientes del conjunto 908 objetivo de detección. A su vez, el módulo 360 de ensayo de detección puede determinar si alguna indicación 912 de cuantificación corregida resultante es negativa y puede proporcionar una notificación de indicación de cuantificación corregida en caso de que se calcule cualquier indicación 912 de cuantificación corregida negativa. Por ejemplo, la notificación de indicación de cuantificación corregida puede dar como resultado una indicación 924 de notificación de datos. Los detalles de la notificación de indicación de cuantificación corregida también pueden proporcionarse en el listado 926 detallado de notificaciones de datos, si está presente. La notificación de indicación de cuantificación corregida puede ser una notificación cautelar en la que se presenta al usuario una indicación de la notificación con fines informativos o puede dar como resultado un fallo que impida el procesamiento posterior por parte del módulo 360 de ensayo de detección. Además, una indicación 912 de cuantificación corregida negativa puede resaltarse en el listado 904 de conjuntos objetivo por medio de valores resaltados y/o valores proporcionados en un color, tamaño, formato de texto particular o similar.

Una vez que se han calculado las indicaciones 912 de cuantificación corregidas para cada uno de los conjuntos 908 objetivo de detección, las indicaciones 912 de cuantificación corregidas pueden representarse en el área 916 de representación. Además, se puede mostrar una línea 918 de tendencia correspondiente a un ajuste de regresión lineal de las indicaciones 912 de cuantificación corregidas. Se puede proporcionar una pantalla 920 del intervalo del factor de dilución optimizado que refleje la pendiente 514 de la línea 918 de tendencia como se ha descrito anteriormente en relación con el análisis para determinar un intervalo del factor de dilución optimizado. Además, también se puede proporcionar un valor  $R^2$  512 en la pantalla 920 del intervalo del factor de dilución optimizado. Se puede solicitar al usuario que revise el área 916 de representación y/o la pantalla 920 del intervalo del factor de dilución optimizado para verificar los parámetros de calidad de la dilución u otros valores que se muestran en ella. Esto puede incluir que se pida al usuario que compruebe el valor 514 de pendiente o el valor  $R^2$  512 para determinar si el ajuste resultante de las indicaciones de cuantificación corregidas está dentro de un intervalo aceptable. El intervalo aceptable puede mostrarse en la pantalla 920 del intervalo del factor de dilución optimizado o los propios valores del intervalo del factor de dilución optimizado pueden resaltarse o indicarse de otro modo como aceptables o inaceptables para un intervalo

aceptable dado que se define para los parámetros de calidad de dilución del ajuste. Por ejemplo, los valores del intervalo del factor de dilución optimizado que se muestran en la pantalla 920 del intervalo del factor de dilución optimizado pueden resaltarse en un color particular para designar si el valor es aceptable o inaceptable. Por ejemplo, los valores pueden resaltarse en verde para los valores aceptables o pueden resaltarse en rojo para los valores inaceptables. De forma alternativa o adicional, el color del texto puede utilizarse como una indicación de valores aceptables o inaceptables en cualquiera de las pantallas descritas en la presente memoria. El módulo 360 de ensayo de detección puede definir o permitir que el usuario defina (por ejemplo, mediante una entrada de la interfaz 380 gráfica de usuario) una definición de un intervalo aceptable para los parámetros de calidad de la dilución (por ejemplo, un intervalo aceptable para la pendiente y/o un intervalo aceptable para el valor de  $R^2$ ). De forma alternativa o adicional, es posible que no se genere una línea 918 de tendencia dentro del área 916 de representación si los parámetros de calidad de la dilución para las indicaciones 912 de cuantificación corregidas no están dentro de un intervalo aceptable correspondiente. Además, si los parámetros de calidad de la dilución no están dentro del intervalo aceptable, se puede presentar una notificación de ajuste al usuario. La notificación de ajuste puede incluir una pantalla para el usuario, tal como un resaltado u otra indicación de que un parámetro de calidad de la dilución está fuera de un intervalo aceptable. La notificación de ajuste también puede dar como resultado un indicador 924 de notificación de datos y un listado de la notificación de ajuste en el listado 926 detallado de notificaciones de datos. En este sentido, la notificación de ajuste puede ser una notificación cautelar que permita al usuario anular la notificación y continuar calculando el intervalo de dilución optimizado. De forma alternativa, es posible que no se muestre un intervalo de dilución opcional hasta que y a menos que se determine que los parámetros de calidad de la dilución están dentro de un intervalo aceptable (por ejemplo, mediante la deleción una o más de las indicaciones 912 de cuantificación corregidas para que no se utilicen en el cálculo de la línea 918 de tendencia). Además, se puede proporcionar una línea 922 de tendencia idealizada en el área 916 de representación para ayudar al usuario a revisar la línea 918 de tendencia.

Una vez que se ha confirmado que la línea 918 de tendencia refleja el intervalo dinámico del instrumento, el intervalo del factor de dilución optimizado puede presentarse al usuario en la pantalla 920 del intervalo del factor de dilución optimizado. Como se ha descrito anteriormente, el intervalo del factor de dilución optimizado puede extenderse entre un límite de factor de dilución inferior correspondiente al límite de concentración de rendimiento superior y un límite de factor de dilución superior correspondiente al límite de concentración de rendimiento inferior. El límite de concentración de rendimiento superior y el límite de concentración de rendimiento inferior se pueden proporcionar en la pantalla 920 del intervalo del factor de dilución optimizado junto con un factor de dilución correspondiente enumerado en relación con el mismo. De forma alternativa, se puede presentar un factor de dilución redondeado que comprenda una dilución conveniente para un usuario en la pantalla 920 del intervalo del factor de dilución optimizado. Es decir, el límite del factor de dilución inferior y el límite del factor de dilución superior de un intervalo del factor de dilución optimizado pueden corresponder a factores de dilución que son relativamente incómodos de preparar. Como tal, el módulo 360 de ensayo de detección puede seleccionar uno o más factores de dilución convenientes dentro del intervalo del factor de dilución para presentarlos al usuario para su uso como un factor de dilución optimizado. Esto puede incluir factores de dilución redondeados dentro del intervalo del factor de dilución optimizado. Como ejemplo, si el intervalo del factor de dilución optimizado está entre 88 y 242, se pueden sugerir al usuario factores de dilución redondeados de 100 o 200 como factores de dilución convenientes que permiten una preparación de la muestra de fluido objetivo optimizada y más fácil. En este sentido, el intervalo del factor de dilución optimizado no necesita abarcar entre un límite superior e inferior, sino que podría proporcionarse como un único valor del factor de dilución como se ha descrito anteriormente.

Una vez que se ha presentado al usuario el intervalo del factor de dilución optimizado, se puede realizar un análisis de títulos utilizando el módulo 370 de ensayo de títulos. Esto puede incluir la preparación de muestras 396 de fluido objetivo optimizadas que tengan una dilución dentro del intervalo de dilución objetivo según lo determinado por el módulo 360 de ensayo de detección. En este sentido, las muestras 396 de fluido objetivo optimizadas pueden tener un factor de dilución que esté dentro del intervalo del factor de dilución optimizado. En una realización, el módulo 360 de ensayo de detección puede presentar instrucciones a un usuario en relación con la preparación de las muestras 396 de fluido objetivo optimizadas de modo que las muestras 396 de fluido objetivo optimizadas estén dentro del intervalo del factor de dilución optimizado. En cualquier sentido, las muestras 396 de fluido objetivo optimizadas pueden someterse a una investigación por citometría de flujo mediante la citometría 100 de flujo y los resultados de la citometría de flujo para las muestras 396 de fluido objetivo optimizadas pueden proporcionarse a la base de datos de resultados de la citometría 310 de flujo. Además, también se pueden preparar una o más muestras 399 de fluido de control en blanco optimizadas y someterlas a una investigación por citometría de flujo. Las muestras 399 de fluido de control en blanco optimizadas pueden ser similares a las muestras de fluido de control en blanco de detección que se pueden hacer utilizando una matriz de fluido en blanco de la reserva de muestras correspondiente y, en ausencia de las partículas objetivo, con un factor de dilución correspondiente, como se utiliza para las muestras de fluido objetivo optimizadas (por ejemplo, en una dilución dentro del intervalo de dilución objetivo optimizado). Una muestra 399 de fluido de control en blanco optimizada puede hacerse sin utilizar la matriz de fluido de reserva de muestra correspondiente y, de forma alternativa, puede incluir un tampón de dilución de muestra y/u otros líquidos reactivos en su lugar y con los tintes o manchas correspondientes proporcionados para proporcionar una muestra de fluido de control en blanco en relación con las muestras 396 de fluido objetivo optimizadas.

A su vez, el usuario puede utilizar la pantalla 800 de resultados como se muestra en la Figura 10 mediante la selección de la pestaña 824 de resultados para seleccionar un conjunto objetivo optimizado y un conjunto de control optimizado del listado 850 de resultados. Se puede utilizar un submenú 886 de selección de títulos del menú 878 de designación

de resultados para designar los resultados de la citometría de flujo del listado 850 de resultados como miembros de un conjunto objetivo optimizado de muestras de fluido objetivo optimizadas o miembros de un conjunto de control optimizado que comprende una o más muestras de fluido de control en blanco optimizadas de una manera similar a la explicada anteriormente en relación con la selección del conjunto objetivo de detección y el conjunto de control de detección para el funcionamiento del módulo 360 de ensayo de detección. Es decir, el submenú 886 de selección de títulos también puede tener una selección del conjunto de control optimizado y una selección del conjunto objetivo optimizado en el submenú 886 de selección de títulos que pueden utilizarse para designar un conjunto de control optimizado y un conjunto objetivo optimizado, respectivamente, a partir del listado 850 de resultados.

Con referencia adicional a las Figuras 15-16, se representa la pantalla 1000 de ensayo de títulos. Se puede acceder a la pantalla 1000 de ensayo de títulos seleccionando la pestaña 828 de títulos en la barra 820 de selección de pantalla. La pantalla 1000 de ensayo de títulos puede incluir un listado 1002 de conjuntos de control optimizados que refleja un conjunto 1008 de control optimizado seleccionado por el usuario de la lista 850 de resultados y una lista 1004 de conjuntos objetivo optimizados que refleja un conjunto objetivo optimizado seleccionado por el usuario del listado 850 de resultados. El módulo 370 de ensayo de títulos puede funcionar para calcular los resultados de títulos de partículas para la reserva de muestras objetivo basándose en el conjunto 1006 objetivo optimizado y el conjunto 1008 de control optimizado seleccionados por el usuario. Los resultados de títulos de partículas pueden mostrarse en una porción 1010 de los resultados de títulos de la pantalla 1000 de ensayo de títulos. Los resultados de títulos de partículas pueden incluir un título medio 1012 de la reserva 394 de muestra objetivo, una desviación estándar 1014 de los resultados de la citometría de flujo del conjunto 1006 objetivo optimizado y un coeficiente 1016 de variación para los resultados de títulos de partículas. El título promedio 1012 puede ser una concentración promedio de partículas objetivo en la reserva de muestra objetivo según lo determinado a partir del conjunto 1006 objetivo optimizado.

En relación con la determinación de los resultados 1010 de títulos de partículas, el módulo 370 de ensayo de títulos puede calcular las indicaciones 1026 de cuantificación corregidas para el conjunto 1006 objetivo optimizado en función del conjunto 1002 de control optimizado. Esto puede incluir la sustracción de un resultado promedio del conjunto 1002 de control optimizado de los resultados de la citometría de flujo del conjunto 1004 objetivo optimizado. Al igual que con la operación del módulo 360 de ensayo de detección, si el módulo 370 de ensayo de títulos determina que cualquier indicación 1026 de cuantificación corregida para el conjunto 1006 objetivo optimizado es negativa, se puede presentar una notificación de indicación de cuantificación corregida que puede notificar al usuario la circunstancia que crea la notificación y/o impedir la determinación de los resultados 1010 de títulos de partículas. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 16, también se puede proporcionar un indicador 928 de notificación de datos en la pantalla 1000 de ensayo de títulos en caso de que esté presente una notificación de datos en relación con el funcionamiento del módulo 370 de ensayo de títulos. Si bien no se muestra, también se puede proporcionar un listado detallado de notificaciones de datos como el descrito en relación con la Figura 14 al seleccionar el indicador 926 de notificación de datos para la pantalla 1000 de ensayo de títulos. El listado detallado de notificaciones de datos en la pantalla 1000 de ensayo de títulos puede proporcionar detalles de notificación de datos para el funcionamiento del módulo 270 de ensayo de títulos.

Además, el módulo 370 de ensayo de títulos puede verificar que un factor de dilución para todo el conjunto 1008 de control optimizado y el conjunto 1006 objetivo optimizado esté dentro del intervalo de dilución óptimo establecido por el módulo 360 de ensayo de detección. En el caso de que un resultado esté fuera del intervalo del factor de dilución optimizado, se puede presentar una notificación del factor de dilución en relación con un miembro del conjunto 1008 de control optimizado o del conjunto 1006 objetivo optimizado fuera del intervalo del factor de dilución optimizado, y se puede mostrar el indicador 926 de notificación de datos. También, se puede resaltar el valor que está fuera del intervalo aceptable o se puede cambiar el color, el tamaño o el formato de la fuente para indicar la notificación de datos como se ha descrito anteriormente. Además, se puede establecer un límite absoluto de dilución que puede ser un intervalo más amplio que el intervalo objetivo optimizado. También se puede presentar una notificación del factor de dilución si alguno del conjunto 1008 de control optimizado o del conjunto 1006 objetivo optimizado está fuera del intervalo absoluto del factor de dilución.

Además, puede apreciarse que el resultado 1012 de títulos promedio puede basarse en un factor de dilución del conjunto 1006 objetivo optimizado (por ejemplo, en relación con la extrapolación de las indicaciones de cuantificación de partículas de la muestra diluida a los resultados de partículas en la reserva 394 de fluido de la muestra objetivo no diluida). En este sentido, el módulo 370 de ensayo de títulos puede determinar o calcular un factor 1028 de dilución efectivo para determinar el título promedio 1012. El factor de dilución efectivo puede rellenarse automáticamente en función de los factores de dilución para el conjunto 1006 de control optimizado.

La porción 1010 de resultados del título también puede incluir un límite (SQL) 1018 de calificación de la muestra calculado. El SQL 1018 puede determinarse en función de los resultados de la citometría de flujo para el conjunto 1006 objetivo optimizado y el conjunto 1008 de control optimizado. El SQL 1018 puede corresponder a un límite en el que se puede determinar un resultado de muestra con la precisión y exactitud adecuadas en una matriz dada de resultados de muestra. El SQL 1018 puede determinarse en función del resultado promedio del conjunto 1008 de control optimizado, la variabilidad observada del conjunto 1006 objetivo optimizado (por ejemplo, como se refleja en la desviación estándar del conjunto de control optimizado) y el grado 1020 de confianza deseado. El usuario puede seleccionar el grado 1012 de confianza deseado en la porción 1010 de resultados del título. En este sentido, el SQL

1018 se puede utilizar para determinar si el resultado de la muestra es estadísticamente significativamente mayor que una señal de fondo de la matriz de la muestra. El SQL 1018 puede calcularse en función del promedio de los resultados del conjunto 1008 de control optimizado. Específicamente, se puede calcular una desviación estándar del conjunto 1008 de control optimizado. También se puede calcular un intervalo de confianza en función de la desviación estándar del conjunto 1008 de control optimizado. El intervalo de confianza puede ser la desviación estándar del conjunto 1008 de control optimizado multiplicada por un valor de confianza apropiado determinado a partir de una tabla de distribución t. El valor de confianza puede determinarse en función de los grados de libertad de los datos (por ejemplo, un valor inferior en uno al número de réplicas del conjunto 1008 de control optimizado) y en función del grado 1020 de confianza seleccionado. El valor de confianza resultante puede añadirse al valor medio de las mediciones del conjunto de control optimizado para definir el SQL 1018.

Como se representa en la Figura 17, el SQL 1018 se representa como una barra de error en relación con un resultado de muestra 1022 de fluido de control en blanco optimizado en una representación. Como puede apreciarse, el resultado de la muestra 1024 de fluido objetivo optimizado correspondiente al resultado de la muestra 1022 de fluido de control en blanco optimizado representado en la Figura 12 se proporciona fuera del SQL 1018, como se muestra en relación con el resultado de la muestra 1022 de fluido de control en blanco optimizado. Sin embargo, si un resultado de la muestra 1024 de fluido objetivo optimizado no está fuera del SQL 1018 definido en relación con un resultado de la muestra 1022 de fluido de control en blanco optimizado correspondiente, se puede proporcionar una notificación de SQL en la interfaz 380 gráfica de usuario. Además, la notificación SQL puede impedir el cálculo del título de partículas promedio en la porción de resultado del título de partículas.

El módulo 370 de ensayo de títulos puede realizar otra confirmación de los datos utilizados para calcular los resultados de títulos de partículas y/o los propios resultados de títulos de partículas. En este sentido, se puede proporcionar una notificación de títulos si alguno de los resultados 1010 de títulos de partículas está fuera de un límite aceptable definido, que un usuario puede proporcionar o definir para cualquiera del título promedio 1012 de la reserva 394 de muestra objetivo, una desviación estándar 1014 de los resultados de citometría de flujo del conjunto 1006 objetivo optimizado y un coeficiente 1016 de variación para los resultados de títulos de partículas.

Si bien la invención se ha ilustrado y descrito en detalle en los dibujos y en la descripción anterior, dicha ilustración y descripción deben considerarse de carácter ilustrativo y no restrictivo. Por ejemplo, ciertas realizaciones descritas anteriormente en la presente memoria pueden combinarse con otras realizaciones descritas y/o disponerse de otras maneras (por ejemplo, los elementos del proceso pueden realizarse en otras secuencias). En consecuencia, debe entenderse que solo se han mostrado y descrito la realización preferida y variantes de la misma y que se desea proteger todos los cambios y modificaciones que están cubiertos por las reivindicaciones.

La descripción de una característica o características en una combinación particular no excluye la inclusión de una característica o características adicionales en una variación de la combinación particular. Las etapas de procesamiento y la secuenciación son solo para ilustración, y dichas ilustraciones no excluyen la inclusión de otras etapas u otra secuenciación de etapas en una medida no necesariamente incompatible. Pueden incluirse etapas adicionales entre las etapas de procesamiento ilustradas o antes o después de cualquier etapa de procesamiento ilustrada en una medida no necesariamente incompatible.

Las expresiones “que comprende”, “que contiene”, “que incluye” y “que tiene”, y las variaciones gramaticales de estas expresiones, pretenden ser inclusivos y no limitantes en el sentido de que el uso de dichas expresiones indica la presencia de una condición o característica declarada, pero no la exclusión de la presencia también de cualquier otra condición o característica. El uso de las expresiones “que comprende”, “que contiene”, “que incluye” y “que tiene”, y las variaciones gramaticales de esas expresiones para referirse a la presencia de uno o más componentes, subcomponentes o materiales, también incluyen y pretenden describir realizaciones más específicas en las que la expresión “que comprende”, “que contiene”, “que incluye” o “que tiene” (o la variación de dicha expresión), según sea el caso, se reemplaza por cualquiera de las expresiones más restringidas “que consisten esencialmente en” o “que consiste en” o “que consiste únicamente en” (o cualquier variación gramatical apropiada de dichas expresiones más restringidas). Por ejemplo, una declaración de que algo “comprende” un elemento o elementos declarados también tiene la intención de incluir y describir las realizaciones más específicas y restringidas de la cosa “que consiste esencialmente en” el elemento o elementos declarados, y la cosa “que consiste en” el elemento o elementos declarados. Se han proporcionado ejemplos de diversas características con fines ilustrativos, y las expresiones “ejemplo”, “por ejemplo” y similares indican ejemplos ilustrativos que no son limitantes y no deben considerarse como una limitación de una característica o características a ningún ejemplo particular. La expresión “al menos” seguida de un número (por ejemplo, “al menos uno”) significa ese número o más que ese número. Como se usa en la presente memoria, un intervalo para una característica se refiere a uno o más valores para esa característica dentro de un límite superior y un límite inferior, incluyendo el límite superior e inferior, e incluye situaciones en las que el límite superior y el límite inferior son los mismos, es decir, cuando el intervalo incluye un único valor representado por el límite superior e inferior iguales.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de citometría de flujo para la cuantificación de partículas objetivo con atributos de partículas particulares en una reserva (394) de fluido de la muestra objetivo que utiliza un citómetro (100) de flujo que operable para hacer fluir una muestra de fluido a través de una zona de investigación por citometría de flujo sometida a investigación de radiación de excitación y para detectar y medir la radiación de respuesta de la zona de investigación y para determinar y emitir un resultado de la citometría de flujo que incluye una indicación de cuantificación de las partículas objetivo en cada una de dichas muestras de fluido, comprendiendo el método:

someter a una primera evaluación por citometría de flujo un conjunto (406) objetivo de detección de muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección que comprende una serie de diluciones de la reserva (390) de fluido de muestra de detección diluido en una pluralidad de factores de dilución, en donde el sometimiento a una primera evaluación por citometría de flujo comprende:

hacer fluir cada una de dichas muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección a través de la zona de investigación del citómetro (100) de flujo y en la zona de investigación someter cada una de dichas muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección a la radiación de excitación de investigación,

detectar la radiación de respuesta de la zona de investigación y generar para cada una de dichas muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección un resultado de dicha citometría de flujo que incluye dicha indicación de cuantificación de las partículas objetivo para la muestra de fluido objetivo de detección, y

almacenar los resultados de la citometría de flujo para el conjunto (406) objetivo de detección en la memoria (320) del ordenador, teniendo la memoria (320) almacenada en ella un módulo (360) de ensayo de detección accesible y ejecutable por un procesador (330) y un módulo (370) de ensayo de títulos accesible y ejecutable por el procesador (330);

ejecutar el módulo (360) de ensayo de detección mediante el procesador (330), en donde dicha ejecución del módulo (360) de ensayo de detección comprende:

calcular una indicación de cuantificación corregida para cada una de al menos una porción de pluralidad de las muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección,

caracterizándose el método **porque** el cálculo de una indicación de cuantificación corregida para cada una de al menos una porción de pluralidad de muestras de fluido objetivo de detección comprende la comparación de los primeros resultados de la citometría de flujo seleccionados del conjunto (406) objetivo de detección de la memoria (320) con los segundos resultados de la citometría de flujo correspondientes seleccionados de un conjunto (408) de control de detección seleccionado de la memoria (320), incluyendo el conjunto (408) de control de detección al menos una muestra (408a, 408b, 408c, 408d) de fluido de control en blanco de detección correspondiente al conjunto (406) objetivo de detección y basándose, al menos en parte, en la comparación,

ajustando las indicaciones de cuantificación para los primeros resultados de la citometría de flujo seleccionados a las indicaciones de cuantificación corregidas, y

determinar, basándose en el análisis de las indicaciones de cuantificación corregidas, un intervalo del factor de dilución de la muestra optimizado para la reserva (390) de fluido de la muestra de detección y guardar el intervalo del factor de dilución de la muestra optimizado en la memoria (320);

someter a una segunda evaluación por citometría de flujo un conjunto objetivo optimizado de muestras de fluido objetivo optimizadas, comprendiendo cada una la reserva (394) de fluido de la muestra objetivo diluida hasta un factor de dilución de la muestra optimizado dentro del intervalo del factor de dilución de la muestra optimizado, en donde el sometimiento a una segunda evaluación por citometría de flujo comprende:

hacer fluir cada muestra de fluido objetivo optimizada a través de la zona de investigación del citómetro (100) de flujo y, en la zona de investigación, someter cada muestra de fluido objetivo optimizada a la radiación de excitación de investigación,

detectar la radiación de respuesta de la zona de investigación y generar para cada dicha muestra de fluido objetivo optimizada un resultado de la citometría de flujo que incluye dicha indicación de cuantificación de las partículas objetivo para la muestra de fluido objetivo optimizada, y

almacenar los resultados de la citometría de flujo para el conjunto objetivo optimizado en la memoria (320);

ejecutar el módulo (370) de ensayo de títulos con el procesador (330), en donde dicha ejecución del módulo (370) de ensayo de títulos comprende:

acceder a los resultados de la citometría de flujo para el conjunto objetivo optimizado en la memoria (320), y

calcular, utilizando los resultados de citometría de flujo para el conjunto objetivo optimizado, los resultados de títulos de partículas para la reserva (394) de fluido de la muestra objetivo; y

5 almacenar los resultados de títulos de partículas para la reserva (394) de fluido de la muestra objetivo en la memoria (320).

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

10 mostrar en una pantalla (350) de una interfaz (380) gráfica de usuario un listado de resultados correspondiente a los resultados de la citometría de flujo almacenados en la memoria (320), teniendo la interfaz (380) gráfica de usuario un dispositivo (340) de entrada de usuario; y  
15 recibir una primera selección de títulos del usuario por parte del dispositivo (340) de entrada de usuario de la interfaz (380) gráfica de usuario, comprendiendo la primera selección de títulos los resultados de la citometría de flujo para las muestras de fluido objetivo optimizadas que el usuario selecciona del listado de resultados.

3. El método de una cualquiera de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, que comprende además:

20 someter a una tercera evaluación de citometría de flujo el conjunto (408) de control de detección que comprende al menos una muestra (408a, 408b, 408c, 408d) de fluido de control en blanco de detección, y el sometimiento a una tercera evaluación de citometría de flujo que comprende:

25 hacer fluir cada una de dichas muestras (408a, 408b, 408c, 408d) de fluido de control en blanco de detección a través de la zona de investigación del citómetro (100) de flujo y en la zona de investigación someter cada una de dichas muestras (408a, 408b, 408c, 408d) de fluido de control en blanco de detección a la radiación de excitación de investigación, detectar la radiación de respuesta de la zona de investigación y generar para cada una de dichas muestras (408a, 408b, 408c, 408d) de fluido de control en blanco de detección un resultado de dicha citometría de flujo que incluye dicha indicación de cuantificación de las partículas objetivo para la muestra (408a, 408b, 408c, 408d) de fluido de control en blanco de detección;  
30 recibir una segunda selección de detección de un usuario mediante un dispositivo (340) de entrada de usuario de una interfaz (380) gráfica de usuario, comprendiendo la segunda selección de detección los resultados de la citometría de flujo para la al menos una muestra (408a, 408b, 408c, 408d) de fluido de control en blanco de detección de un listado de resultados que se muestra en la interfaz (380) gráfica de usuario; y  
35 acceder a la memoria (320) para recuperar los segundos resultados de la citometría de flujo seleccionados para la al menos una muestra (408a, 408b, 408c, 408d) de fluido de control en blanco de detección basándose en la segunda sección de detección que selecciona el usuario del listado de resultados.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la ejecución del módulo (370) de ensayo de títulos comprende además:

45 calcular los resultados de títulos de partículas para la reserva (394) de fluido de la muestra objetivo utilizando los resultados de la citometría de flujo para el conjunto objetivo optimizado y un conjunto de control optimizado que comprende al menos una muestra de fluido de control en blanco optimizada correspondiente al conjunto objetivo optimizado.

50 5. El método de la reivindicación 4, en donde la ejecución del módulo (370) de ensayo de títulos comprende además:

55 determinar un límite (SQL) de calificación de la muestra para los resultados de la citometría de flujo para el conjunto objetivo optimizado en función de los resultados de la citometría de flujo para el conjunto de control optimizado; y  
proporcionar en una interfaz (380) gráfica de usuario una indicación de una notificación de SQL si el resultado de la citometría de flujo para uno cualquiera de los conjuntos objetivo optimizados no supera el SQL.

60 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde, al ejecutar el módulo (360) de ensayo de detección, la determinación de un factor de dilución de la muestra optimizado comprende además:

65 calcular un ajuste de las indicaciones de cuantificación corregidas en relación con múltiples de dichos factores de dilución de la serie de diluciones, en donde la porción de pluralidad de las muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección de los primeros resultados de la citometría de flujo seleccionados representan los dichos múltiples factores de dilución.

7. El método de la reivindicación 6, en donde la ejecución del módulo (360) de ensayo de detección comprende además:
- 5                   comparar el ajuste en relación con uno o más parámetros de calidad de dilución, en donde el intervalo del factor de dilución optimizado de la muestra se determina después de que el ajuste se conforme a los parámetros de calidad de dilución aceptables; y
- 10                   proporcionar una indicación de una notificación de ajuste si el ajuste para una dicha porción de pluralidad de muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección no se conforma a los parámetros de calidad de dilución aceptables.
8. El método de una cualquiera de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7, en donde el intervalo optimizado del factor de dilución de la muestra se define entre un límite (706) de factor de dilución optimizado superior y un límite (708) de factor de dilución optimizado inferior, en donde el límite (706) de factor de dilución optimizado superior corresponde a un valor de dilución en el ajuste correspondiente a un límite de concentración del rendimiento optimizado inferior y el límite (708) de factor de dilución optimizado inferior corresponde a un valor de dilución en el ajuste correspondiente a un límite de concentración del rendimiento optimizado superior.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la ejecución del módulo (360) de ensayo de detección comprende además:
- 20                   proporcionar una indicación del intervalo del factor de dilución de la muestra optimizado a un usuario.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde:
- 25                   los resultados del título de partículas comprenden una concentración calculada de las partículas objetivo en la reserva (394) de fluido de la muestra objetivo;
- 30                   la ejecución del módulo (370) de ensayo de títulos comprende además calcular uno o más parámetros de títulos con respecto a los resultados de títulos de partículas;
- 35                   los uno o más parámetros de título comprenden una desviación estándar de múltiples de dichas concentraciones correspondientes a múltiples de dichas muestras de fluido objetivo optimizadas;
- 40                   los uno o más parámetros de títulos comprenden un coeficiente de variación de múltiples de dichas concentraciones correspondientes a múltiples de dichas muestras de fluido objetivo optimizadas; y
- 45                   la ejecución del módulo (370) de ensayo de títulos comprende además proporcionar una indicación en una interfaz (380) gráfica de usuario de una notificación de títulos si se determina que dicho parámetro de títulos está fuera de un intervalo de valores de parámetro de títulos aceptable correspondiente.
11. Un sistema (300) de citometría de flujo para la cuantificación de partículas en una reserva (394) de fluido de muestra objetivo, comprendiendo el sistema (300) de citometría de flujo:
- 50                   un citómetro (100) de flujo operable para hacer fluir una muestra de fluido a través de una zona de investigación de citometría de flujo sometida a radiación de excitación de investigación y para detectar y medir la radiación de respuesta desde la zona de investigación y para determinar y emitir un resultado de la citometría de flujo que incluye una indicación de cuantificación de las partículas objetivo con atributos de partícula particulares en cada una de dichas muestras de fluido;
- 55                   el sistema (300) de citometría de flujo que comprende además:
- 60                   una memoria (320) para recibir y almacenar los resultados de la citometría de flujo y que incluye dicho resultado de la citometría de flujo para cada uno de los conjuntos (406) objetivo de detección de una pluralidad de muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección, comprendiendo cada una de dichas muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección, una reserva (390) de fluido de muestra de detección para la evaluación de la citometría de flujo para las partículas objetivo y la pluralidad de muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección que comprenden una serie de diluciones de la reserva del fluido de muestra (390) de detección diluido en una pluralidad de factores de dilución;
- una interfaz (380) gráfica de usuario que comprende una pantalla (350) para presentar a un usuario un listado de resultados correspondiente a los resultados de citometría de flujo almacenados en la memoria (320) y un dispositivo (340) de entrada de usuario para recibir de un usuario una selección de los resultados de la citometría de flujo del listado de resultados;
- un módulo (360) de ensayo de detección ejecutable por un procesador (330) para configurar el procesador (330) para:

acceder a la memoria (320) para recuperar los resultados de la citometría de flujo para el conjunto (406) objetivo de detección basándose en una primera selección de detección que es seleccionada por el usuario del listado de resultados, calcular las indicaciones de cuantificación corregidas de las partículas objetivo para al menos una porción de pluralidad de las muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección de la primera selección de detección que representan múltiples de dichos factores de dilución de la serie de dilución, calcular un ajuste de las indicaciones de cuantificación corregidas en relación con dichos múltiples factores de dilución, determinar un intervalo del factor de dilución de la muestra optimizado para la investigación por citometría de flujo de la reserva (390) de fluido de la muestra de detección utilizando el citómetro (100) de flujo basándose en un análisis del ajuste de las indicaciones de cuantificación corregidas, y

presentar una indicación del intervalo del factor de dilución de la muestra optimizado en la pantalla (350) de la interfaz (380) gráfica de usuario; en donde la memoria (320) funciona además para recibir y almacenar un dicho resultado de la citometría de flujo para cada uno de un conjunto objetivo optimizado de una pluralidad de muestras de fluido objetivo optimizadas, comprendiendo cada una la reserva (394) de fluido de la muestra objetivo para la evaluación por citometría de flujo de las partículas objetivo con los atributos de partícula particulares, en donde la pluralidad de muestras de fluido objetivo optimizadas del conjunto objetivo optimizado comprende un factor de dilución de la reserva (394) de fluido de la muestra objetivo diluido dentro del intervalo del factor de dilución de la muestra optimizado; y un módulo (370) de ensayo de títulos ejecutable por el procesador (330) para configurar el procesador (330) para:

acceder a la memoria (320) para recuperar los resultados de la citometría de flujo para el conjunto objetivo optimizado basándose en una primera selección de títulos que es seleccionada por el usuario del listado de resultados, y determinar los resultados de títulos de partículas para la reserva (394) de fluido de la muestra objetivo basándose en los resultados de citometría de flujo del conjunto objetivo optimizado de la primera selección de títulos y presentar los resultados de títulos de partículas en la pantalla (350) de la interfaz (380) gráfica de usuario.

12. El sistema de citometría de flujo de la reivindicación 11, en donde:

la memoria (320) recibe y almacena un dicho resultado de la citometría de flujo para cada uno de los conjuntos (408) de control de detección con al menos una muestra (408a, 408b, 408c, 408d) de fluido de control en blanco de detección correspondiente al conjunto objetivo de detección; el módulo (360) de ensayo de detección funciona además para:

recuperar los resultados de la citometría de flujo para el conjunto (408) de control de detección basándose en una segunda selección de detección que es seleccionada por el usuario del listado de resultados, confirmar que la segunda selección de detección comprende un dicho resultado de la citometría de flujo para una dicha muestra (408a, 408b, 408c, 408d) de fluido de control en blanco de detección correspondiente a cada una de la porción de pluralidad de las muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección de la primera selección de detección, confirmar si o no la indicación de cuantificación de las partículas objetivo de cada una de dichas muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección de la primera selección de detección es mayor que una dicha indicación de cuantificación correspondiente de las partículas objetivo del conjunto (408) de control de detección de la segunda selección de detección, y comparar uno o más parámetros de calidad de dilución del ajuste con uno o más parámetros de calidad de dilución aceptables, en donde el intervalo del factor de dilución de la muestra optimizado se basa en una porción identificada de dicha pluralidad de las muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección de la primera selección de detección que tienen uno o más parámetros de calidad de dilución aceptables,

en donde la memoria (320) recibe y almacena un dicho resultado de citometría de flujo para un conjunto de control optimizado con al menos una muestra de fluido de control en blanco optimizada correspondiente al conjunto objetivo optimizado; y

el módulo (370) de ensayo de títulos es ejecutable por el procesador (330) para configurar además el procesador (330) para:

5 recuperar los resultados de la citometría de flujo para el conjunto de control optimizado basándose en una segunda selección de títulos que el usuario selecciona del listado de resultados,  
10 en donde los resultados de títulos de partículas para la reserva (394) de fluido de la muestra objetivo se basan en los resultados de la citometría de flujo para el conjunto objetivo optimizado de la primera selección de títulos y el conjunto de control optimizado de la segunda selección de títulos.

13. El sistema de citometría de flujo de la reivindicación 12, en donde el módulo (370) de ensayo de títulos funciona además para:

15 calcular uno o más parámetros de títulos con respecto a los resultados de títulos de partículas, presentar el uno o más parámetros de títulos en la pantalla (350) de la interfaz (380) gráfica de usuario; y

20 proporcionar una indicación de una notificación de títulos si el uno o más parámetros de títulos están fuera de un parámetro de títulos aceptable correspondiente.

14. El sistema de citometría de flujo de una cualquiera de la reivindicación 12 o de la reivindicación 13, en donde el módulo (370) de ensayo de títulos funciona además para:

25 determinar un límite (SQL) de calificación de la muestra para los resultados de la citometría de flujo para el conjunto objetivo optimizado de la primera selección de títulos basándose en los resultados de la citometría de flujo para el conjunto de control optimizado de la segunda selección de títulos; y proporcionar una indicación de una notificación de SQL si el resultado de la citometría de flujo para uno cualquiera de los dichos conjuntos objetivo optimizados no supera el SQL.

30 15. El sistema de citometría de flujo de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde el módulo (360) de ensayo de detección funciona además para:

35 proporcionar una indicación de una notificación de ajuste si el ajuste para una dicha porción de pluralidad de muestras (406a, 406b, 406c, 406d) de fluido objetivo de detección de la primera selección de detección no proporciona un dicho ajuste que tenga parámetros de calidad de dilución que se conformen a dichos uno o más parámetros de calidad de dilución aceptables.

40 16. El sistema de citometría de flujo de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en donde el módulo (370) de ensayo de títulos funciona además para:

45 confirmar que los resultados de la citometría de flujo de la pluralidad de muestras de la primera selección de títulos comprenden un factor de dilución aceptable dentro del intervalo del factor de dilución de la muestra optimizado; y proporcionar una indicación de una notificación de dilución de títulos en la pantalla (350) de la interfaz (380) gráfica de usuario cuando uno cualquiera de los resultados de la citometría de flujo de una pluralidad de muestras de la primera selección de títulos no comprenda un dicho factor de dilución aceptable.

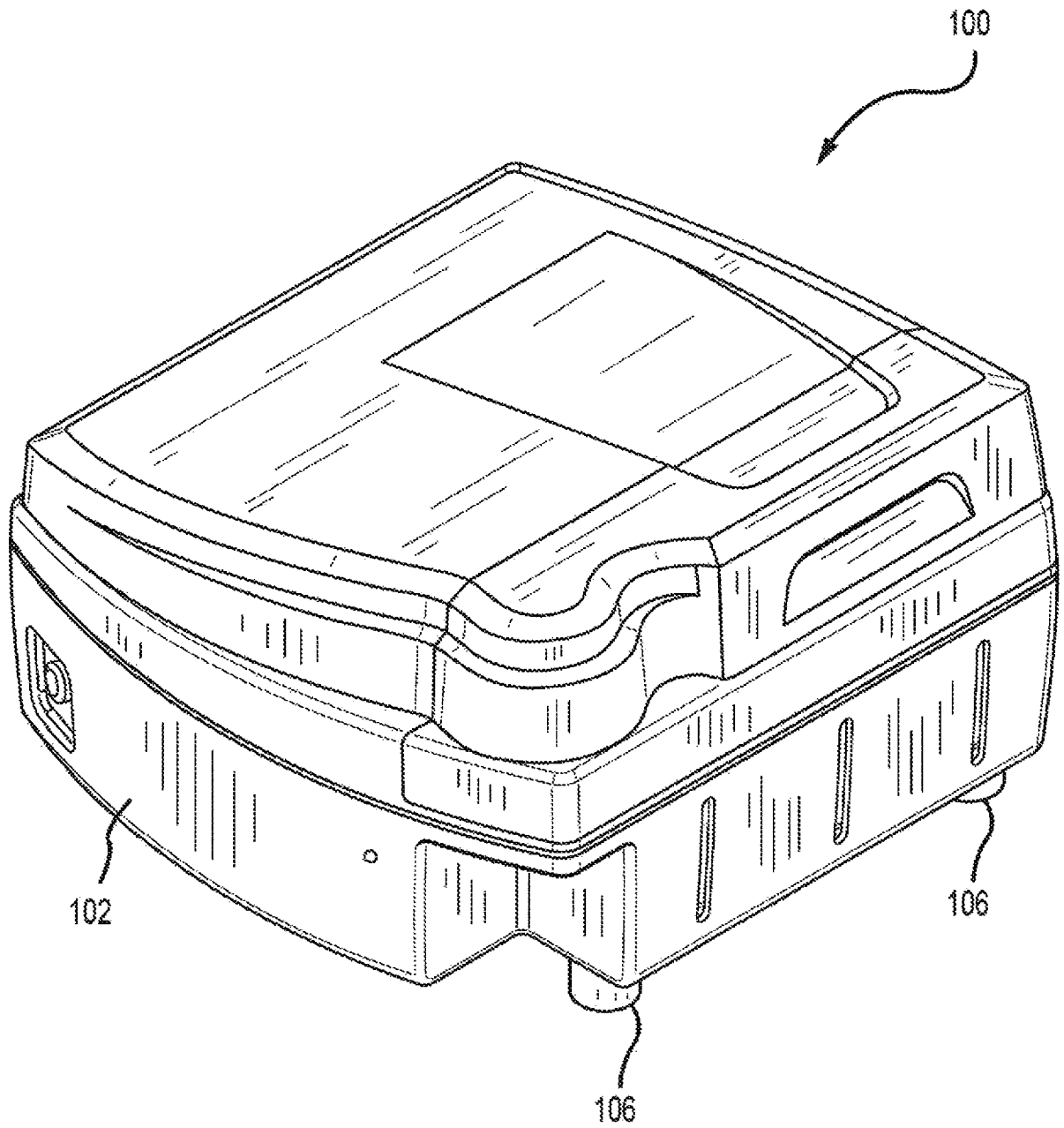


Figura 1A

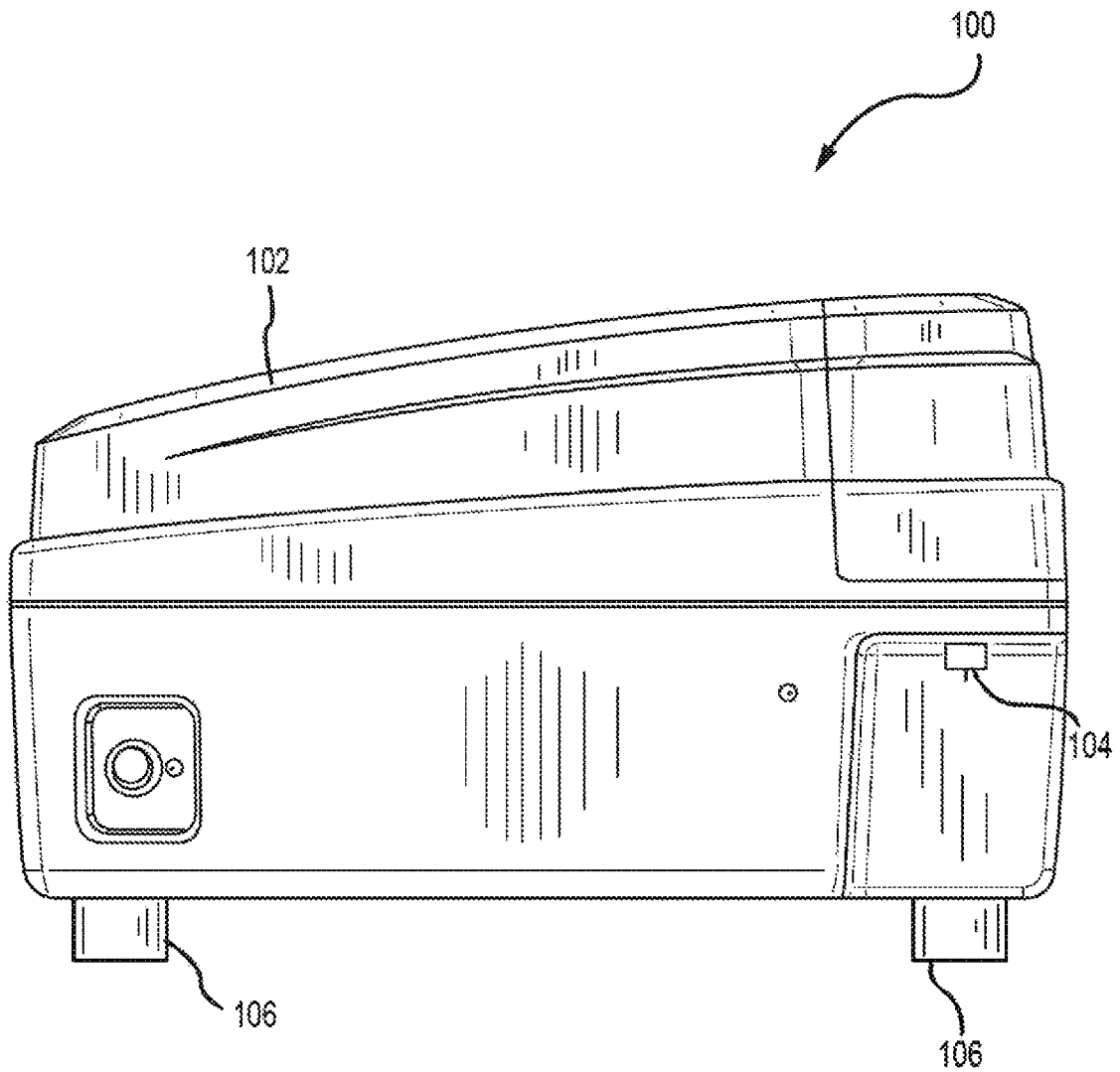


Figura 1B



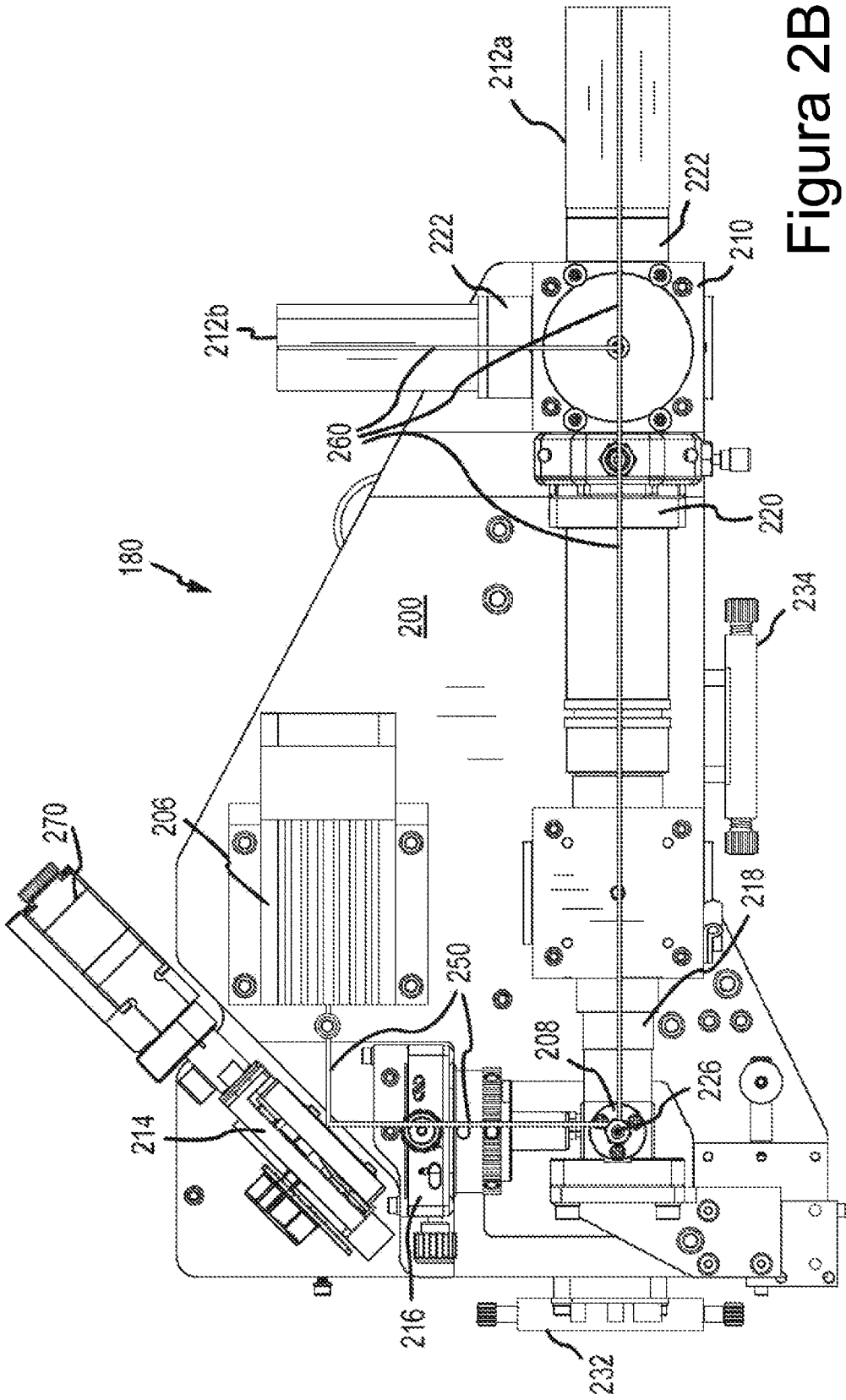


Figura 2B

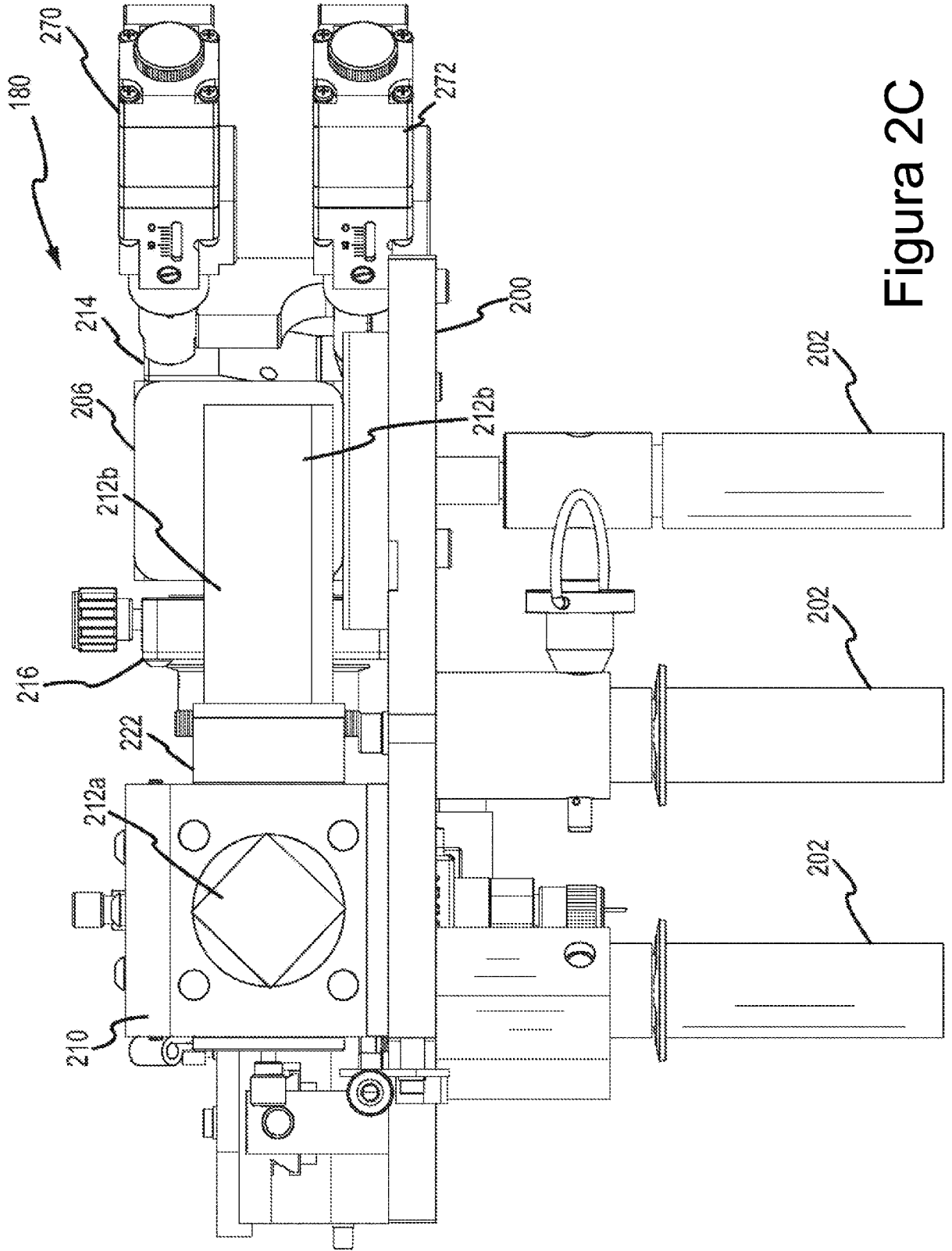


Figura 2C

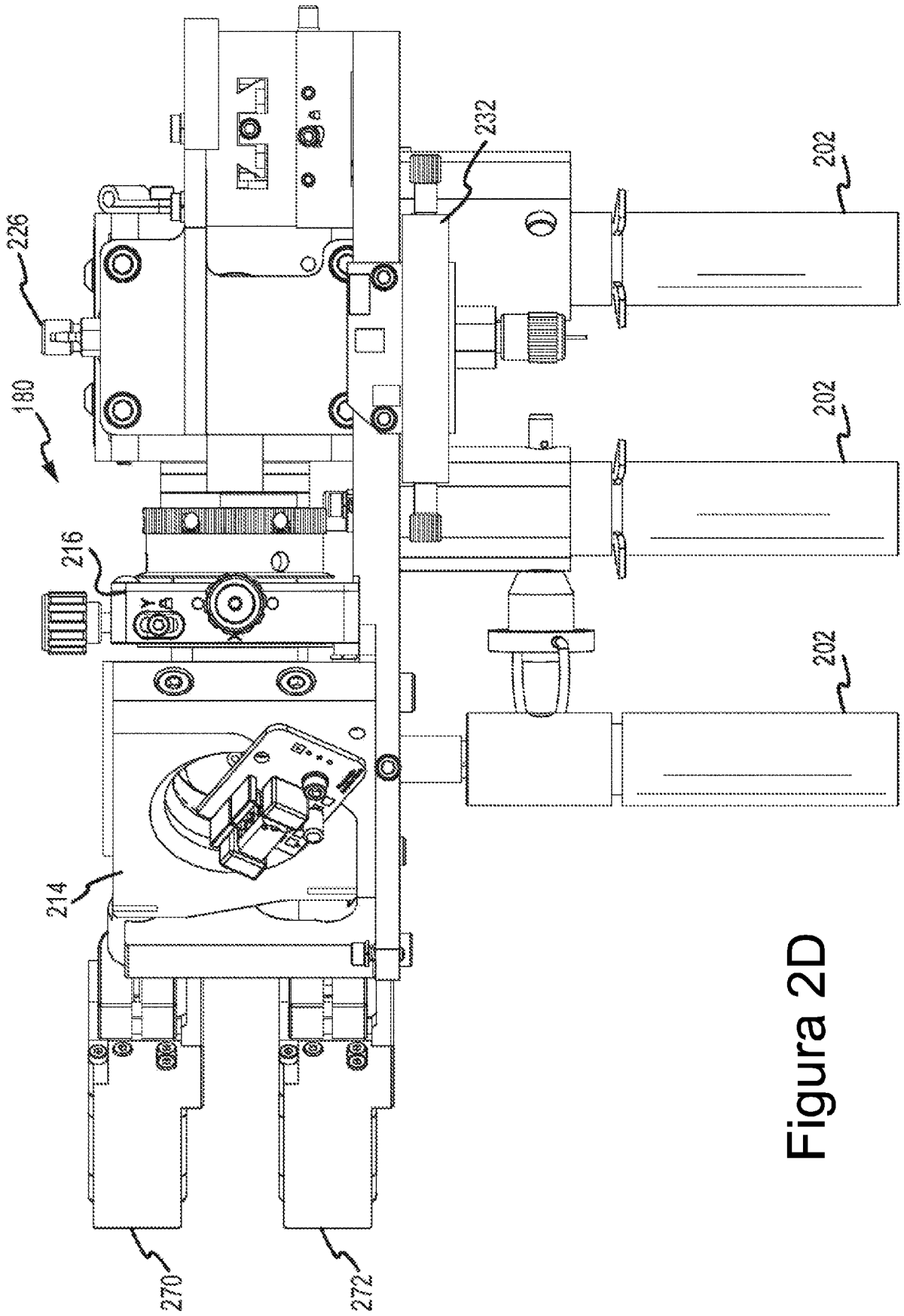


Figura 2D

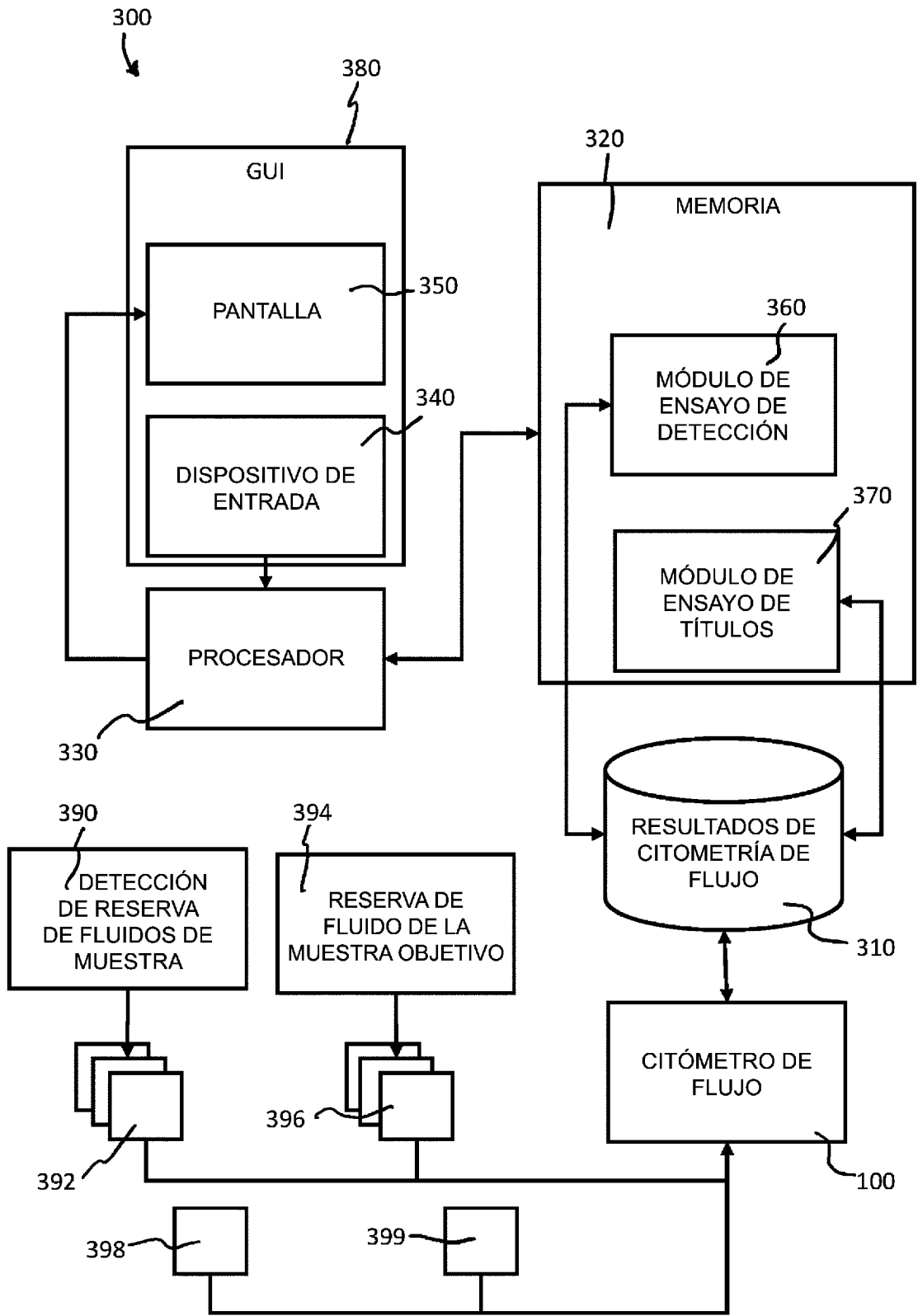


Figura 3

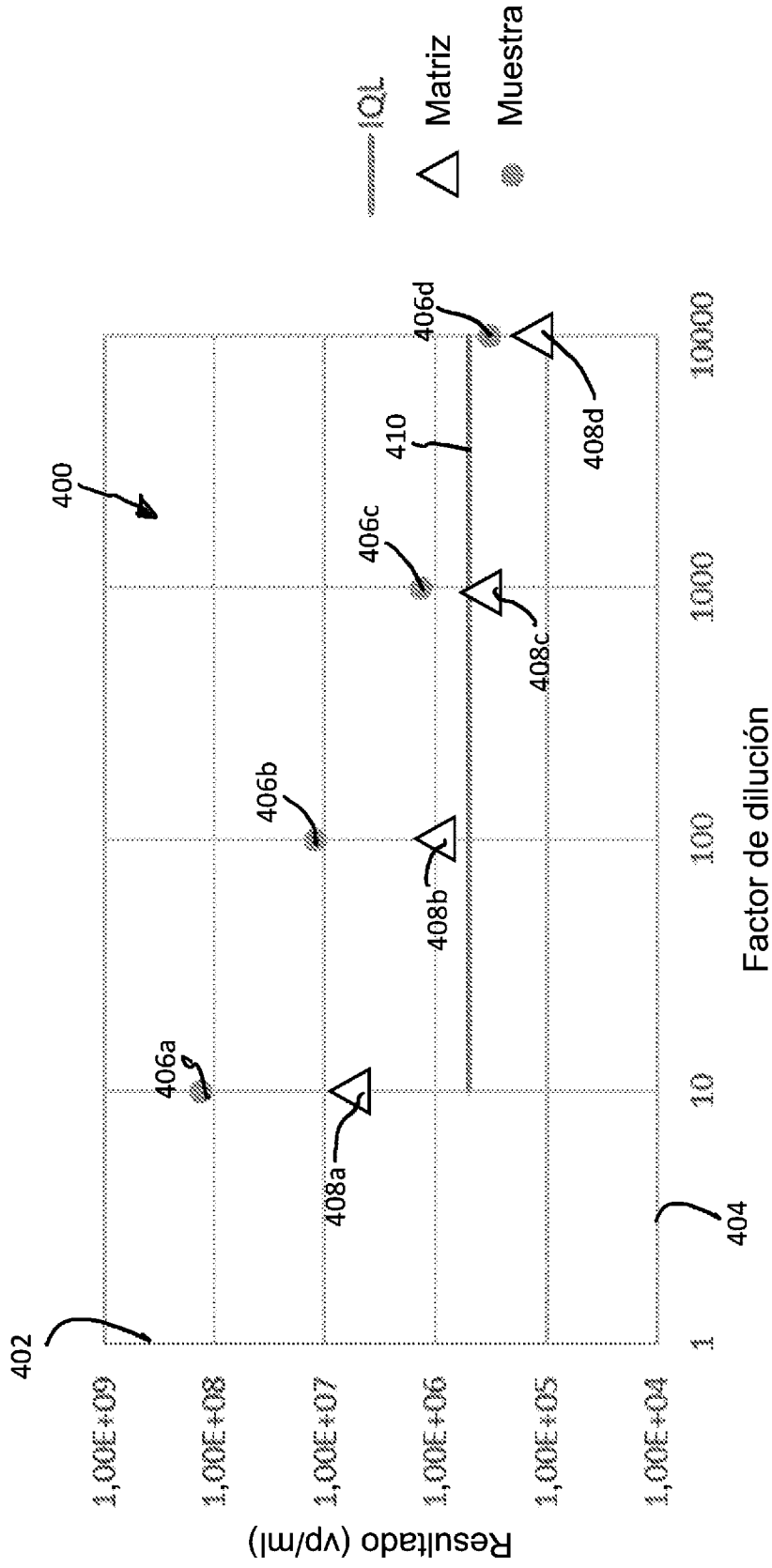


Figura 4

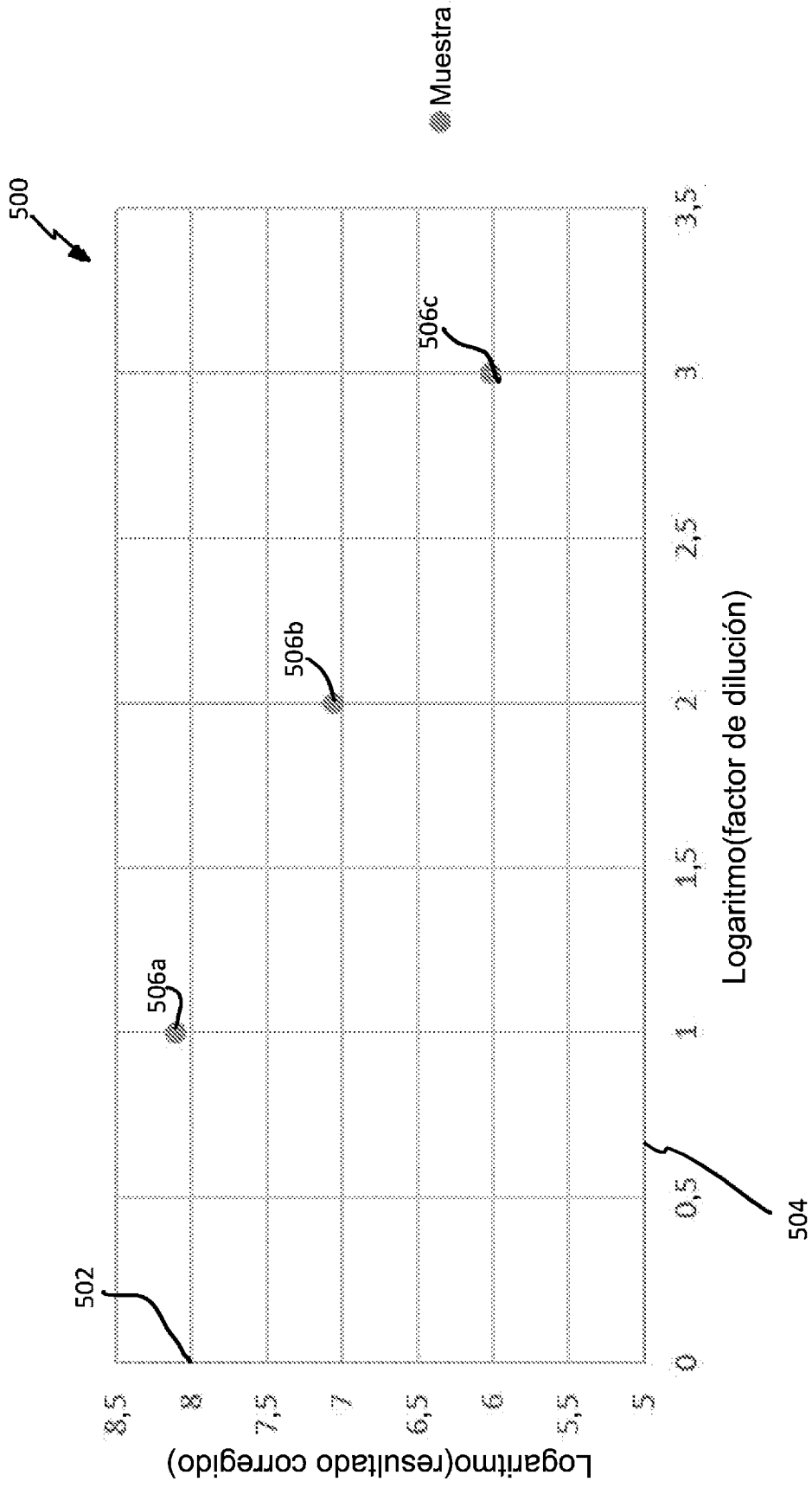
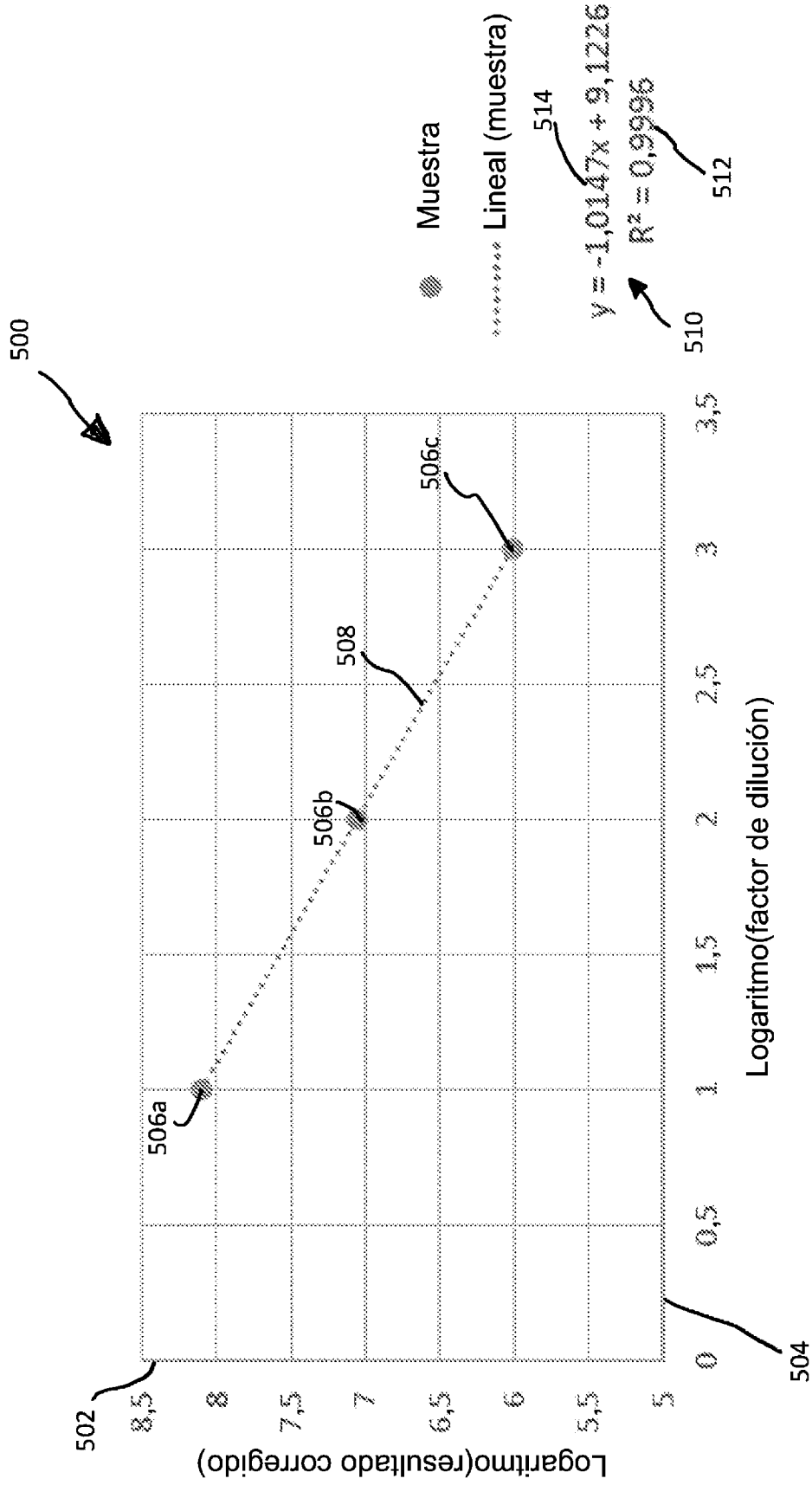


Figura 5



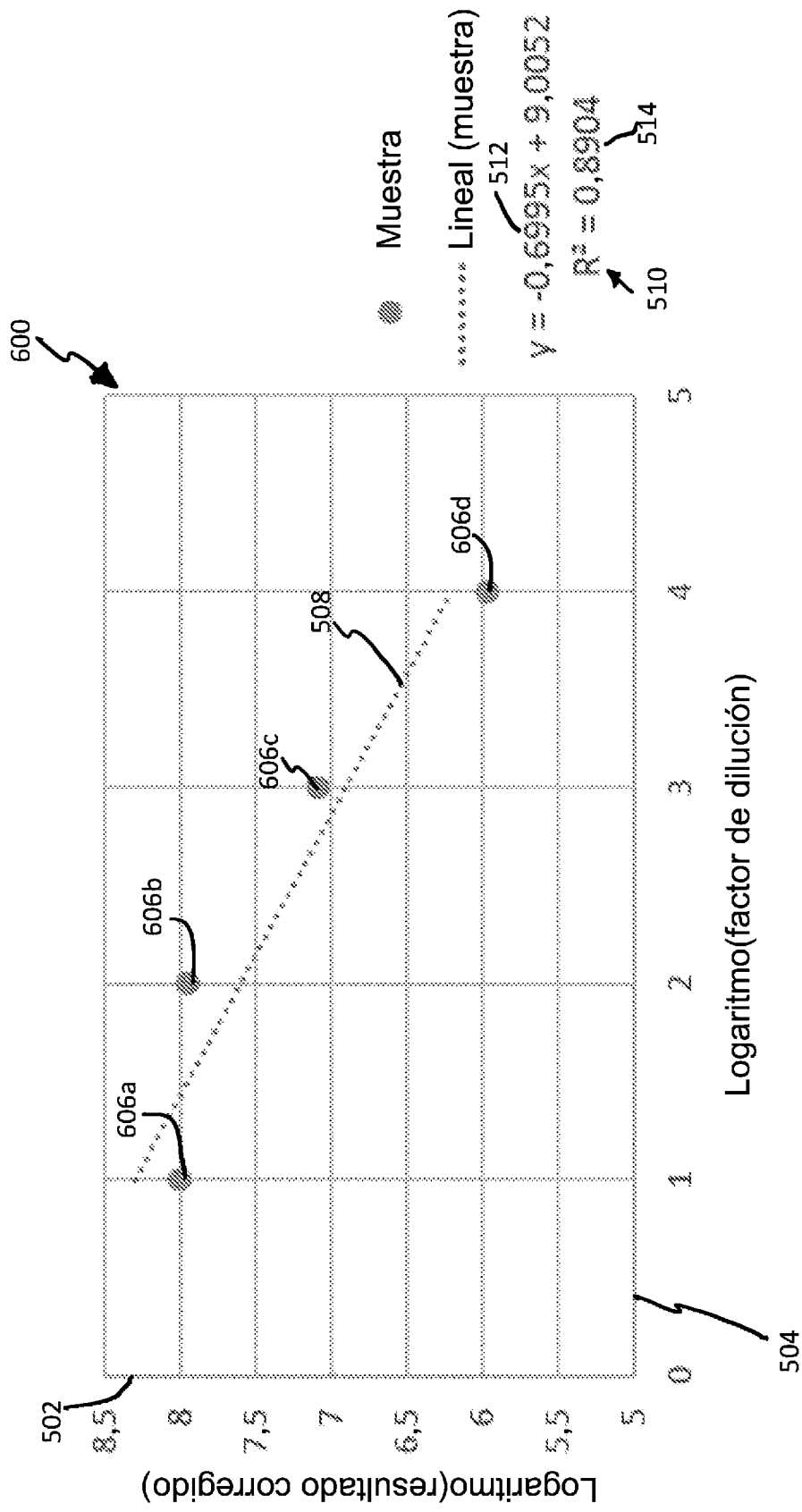


Figura 7

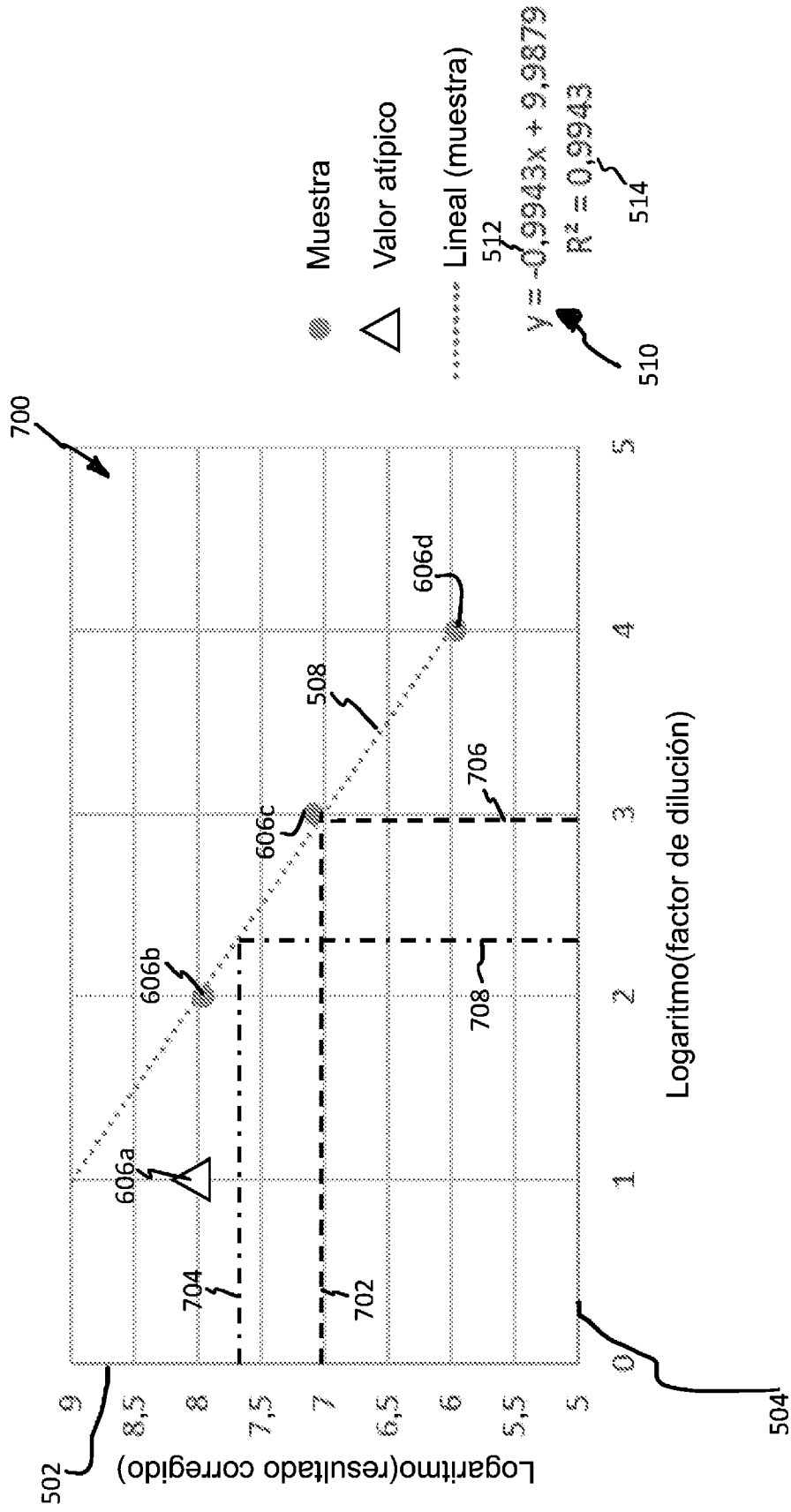


Figura 8

820

822 824 826 828

876

880

852

872

858 856 850 860

810

ARCHIVO OPCIONES VISTA AYUDA

Trabajar sin conexión

Resultado: 0,0E0 vp./mL

ANÁLISIS **RESULTADOS** DETECCIÓN TÍTULO

Usuario: Todos- Instrumento: Todos- Desde: 12/5/2016 Hasta: 12/5/2016 Ocultar validaciones [Buscar]

[Copia de seguridad completa] 874 856 858 850 860

Nombre	Factor de dilución	Resultados (vp/ml)	Título (vp/ml)	Fecha/hora	Recuentos de Vtag1/nucleicos (n.º/ml)	Recuentos de proteínas (n.º/ml)	Vtag1/Alturas de los picos nucleicos (V)
Muestra 500	500	1,4E6	6,8E8	12/05/16 04:48 PM	1,4E6	N/A	0,88 ± 1,70
T500b	500	1,1E6	5,7E8	12/05/16 04:45 PM	1,1E6	N/A	0,90 ± 1,80
T500c	500	1,0E6	5,2E8	12/05/16 04:41 PM	1,0E6	N/A	0,92 ± 1,75
Muestra 1000	1000	6,4E5	6,4E8	12/05/16 04:37 PM	6,4E5	N/A	0,95 ± 1,80
T1000b	1000	7,3E5	7,3E8	12/05/16 04:34 PM	7,3E5	N/A	1,30 ± 2,49
T1000c	1000	8,3E5	8,3E8	12/05/16 04:31 PM	8,3E5	N/A	1,10 ± 1,95
Muestra 2000	2000	4,0E5	8,0E8	12/05/16 04:27 PM	4,0E5	N/A	1,19 ± 2,36
T2000b	2000	4,1E5	8,2E8	12/05/16 04:24 PM	4,1E5	N/A	1,33 ± 2,32
T2000c	2000	5,3E5	1,1E9	12/05/16 04:20 PM	5,3E5	N/A	1,21 ± 2,13
CVF aprobado (120516_041712)	1	2,8E4	2,8E4	12/05/16 04:17 PM	3,2E4	4,5E4	0,42 ± 0,19
Matriz 50	50	4,1E5	2,0E7	12/05/16 04:11 PM	4,1E5	N/A	1,47 ± 2,11
Mancha: Virotag1 Ganancias de PMT Umbral (V) (VT1/N, P): 0,54, N/A Tipo de umbral: Dinámico Y: 3,0,16173,1							
e50b	50	4,1E5	2,1E7	12/05/16 04:08 PM	4,1E5	N/A	1,35 ± 2,17
e50c	50	3,4E5	1,7E7	12/05/16 04:04 PM	3,4E5	N/A	1,31 ± 1,91
Matriz 100	100	2,3E5	2,3E7	12/05/16 04:01 PM	2,3E5	N/A	1,98 ± 2,91
e100b	100	1,9E5	1,9E7	12/05/16 03:58 PM	1,9E5	N/A	1,52 ± 2,43
e100c	100	2,5E5	2,5E7	12/05/16 03:54 PM	2,5E5	N/A	2,13 ± 3,18
Matriz 500	500	6,1E4	3,1E7	12/05/16 03:51 PM	6,1E4	N/A	4,30 ± 4,13
e500b	500	8,5E4	4,2E7	12/05/16 03:47 PM	8,5E4	N/A	3,78 ± 3,93

Comentarios

[+] Comentario [x] Sign

Figura 9

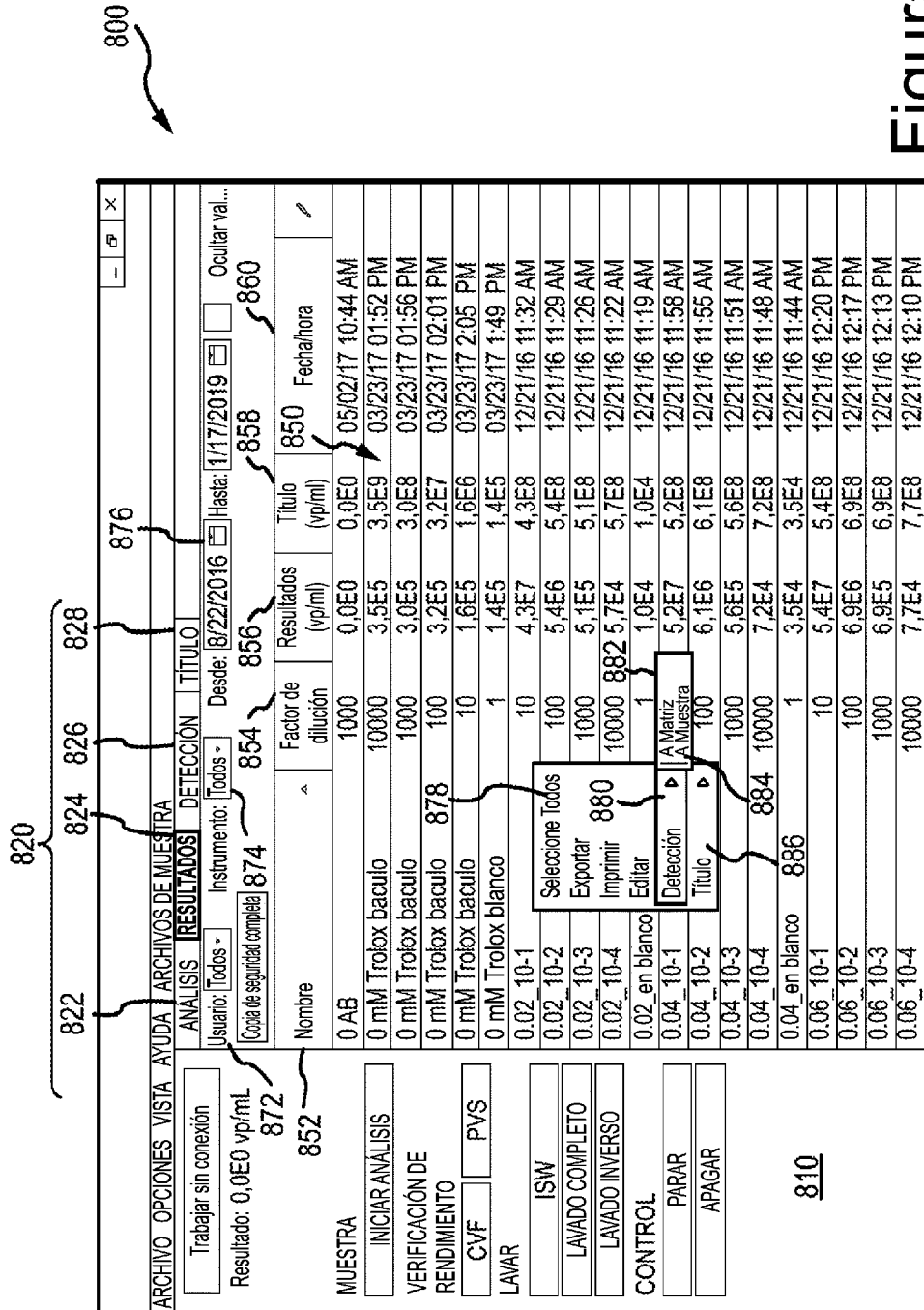


Figura 10

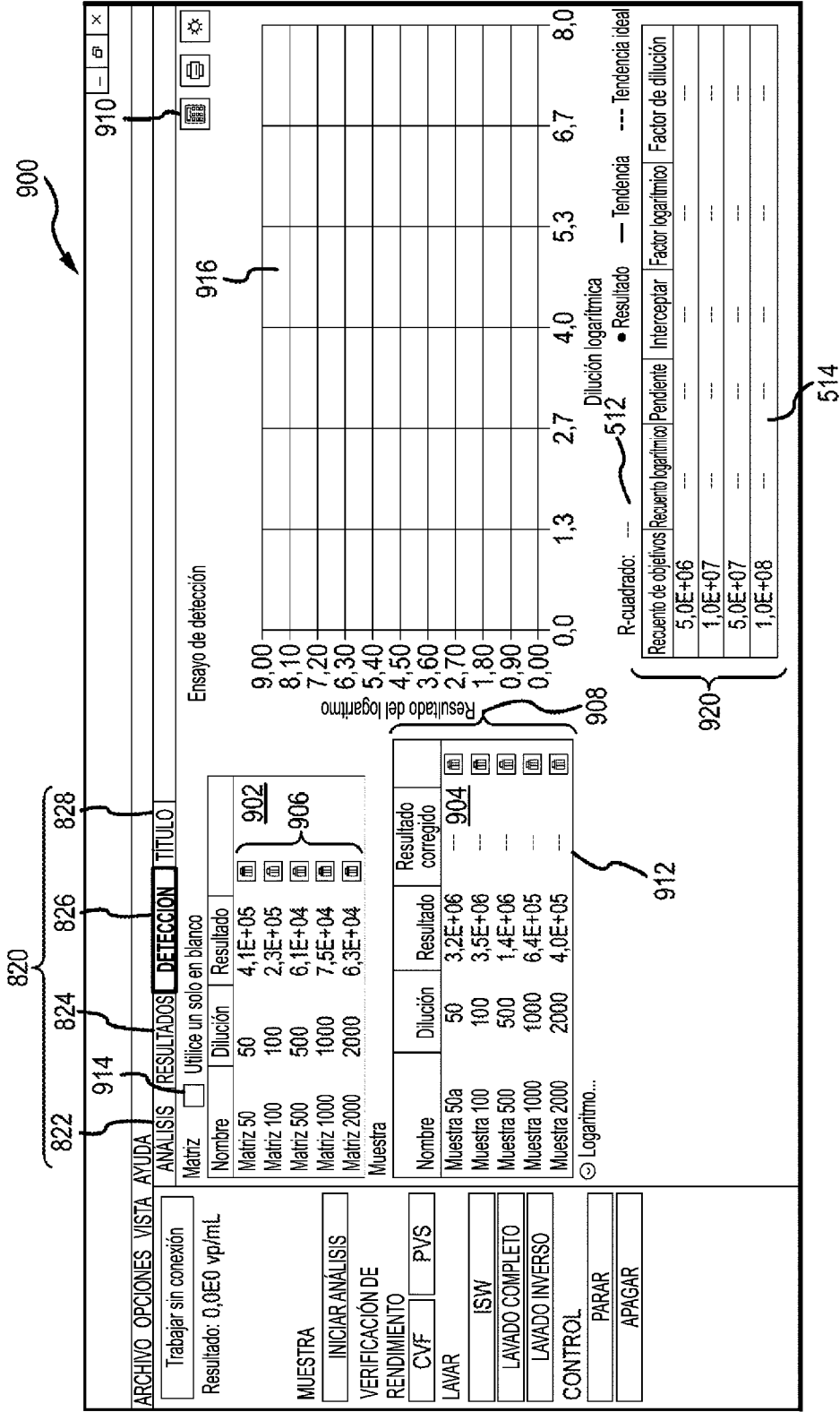


Figura 11

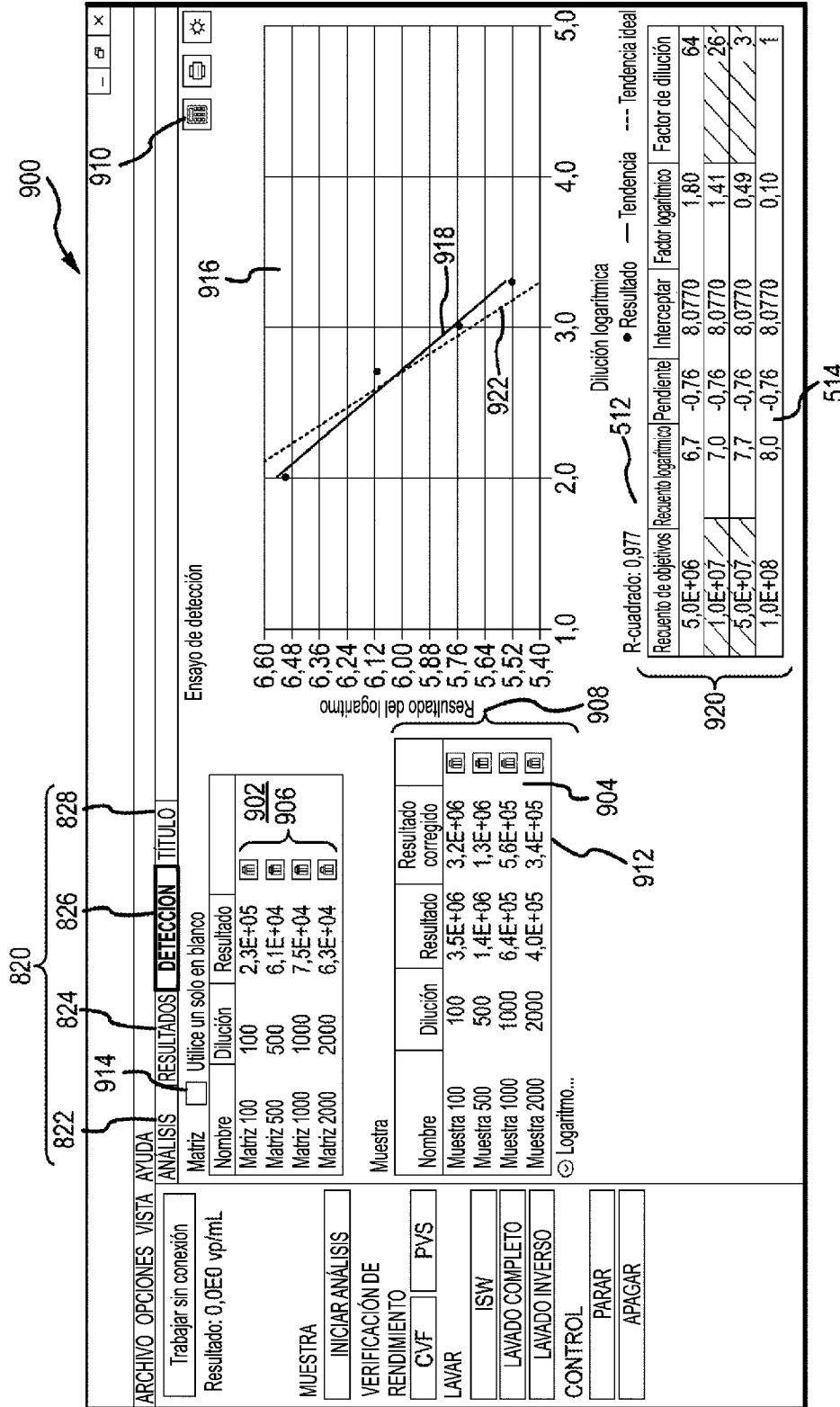
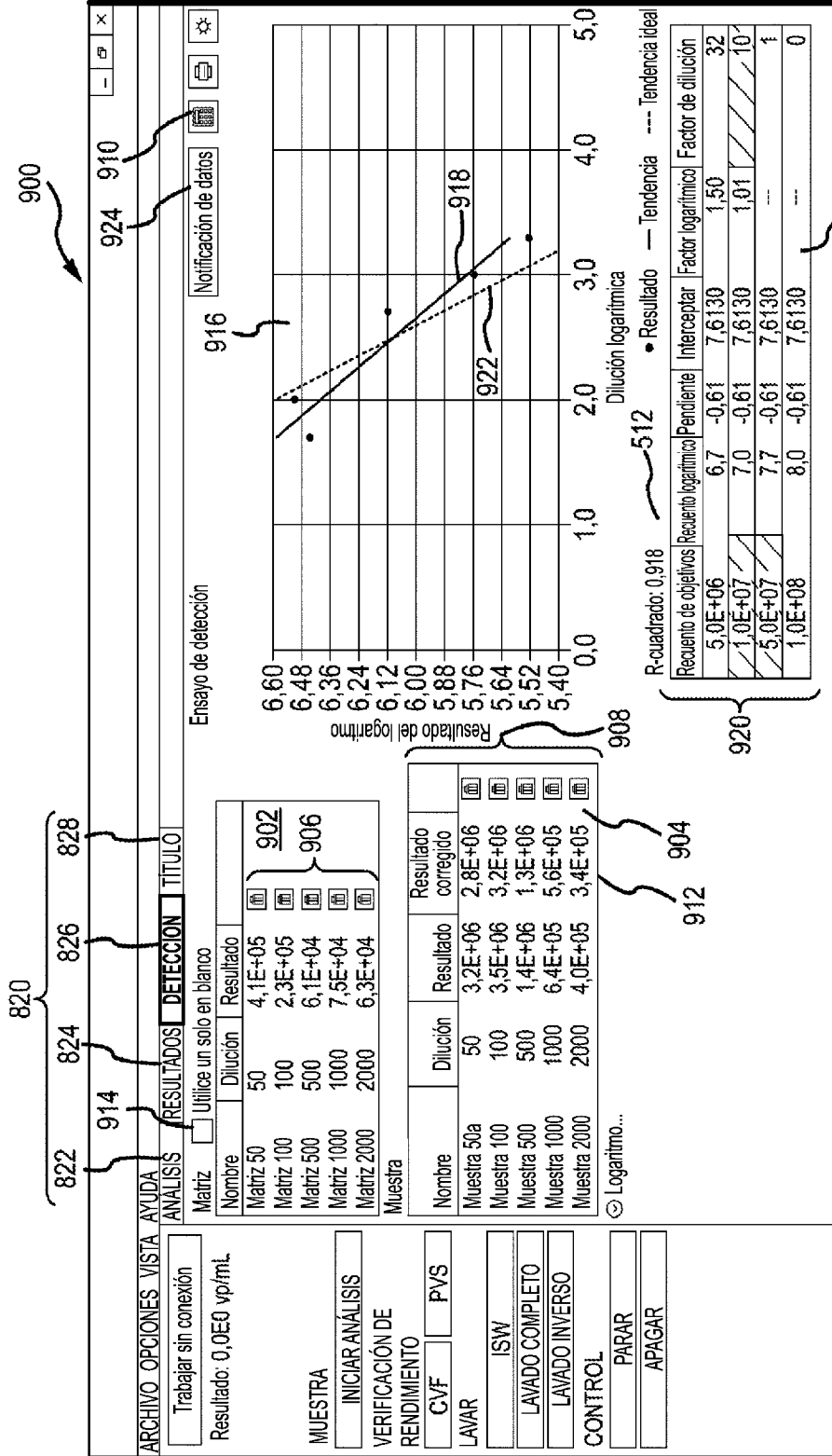


Figura 12



514

Figura 13

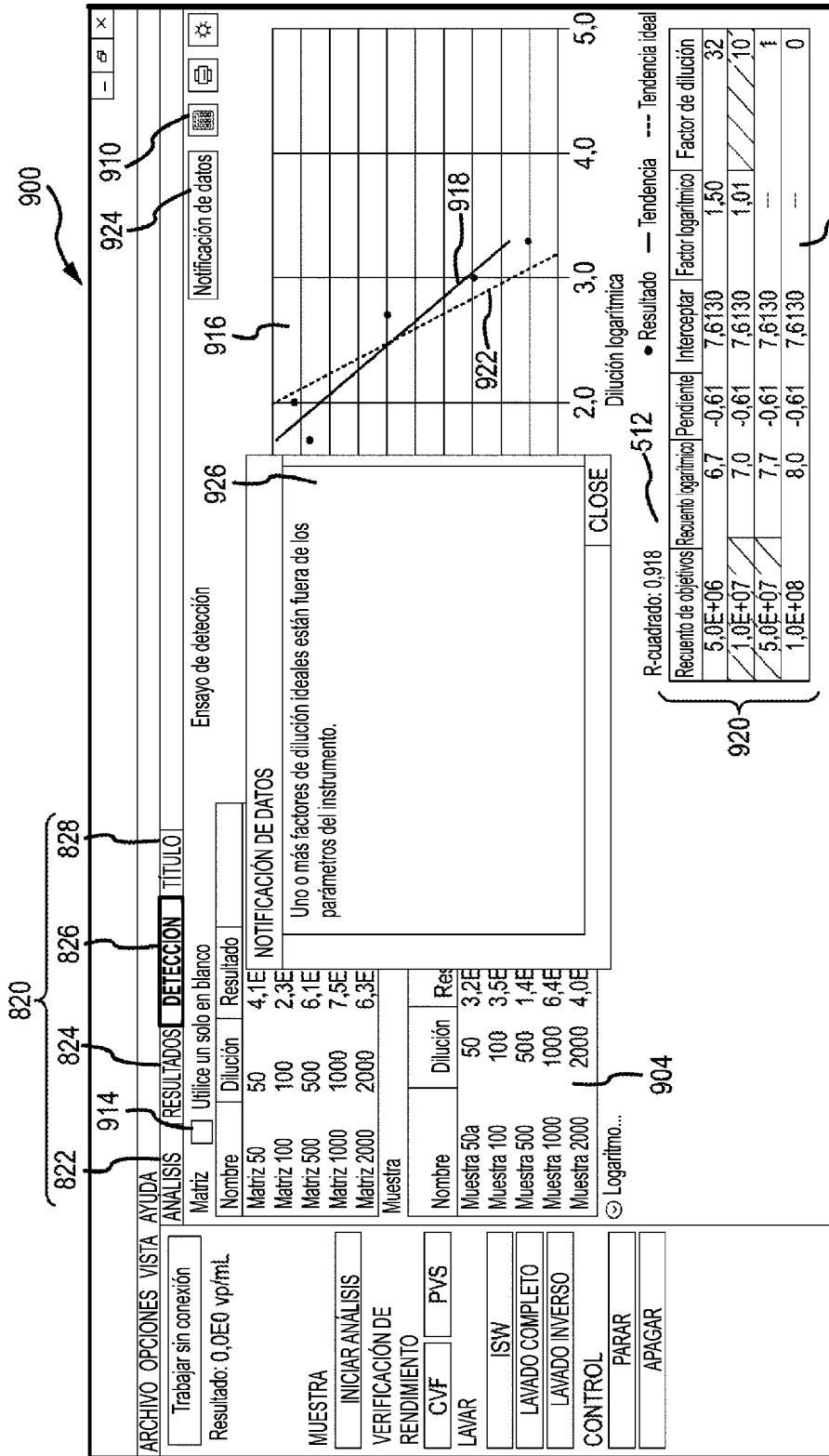


Figura 14

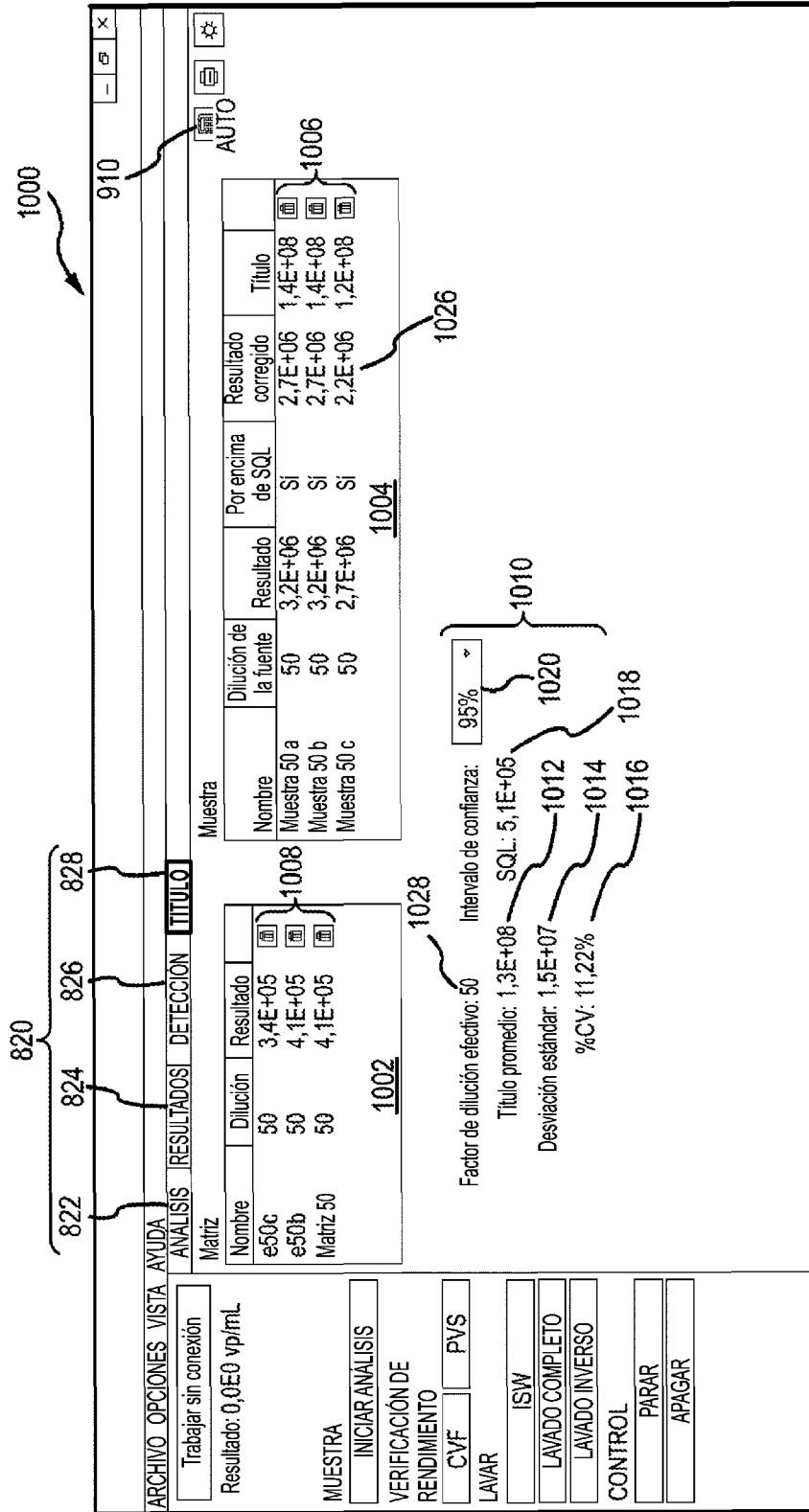


Figura 15

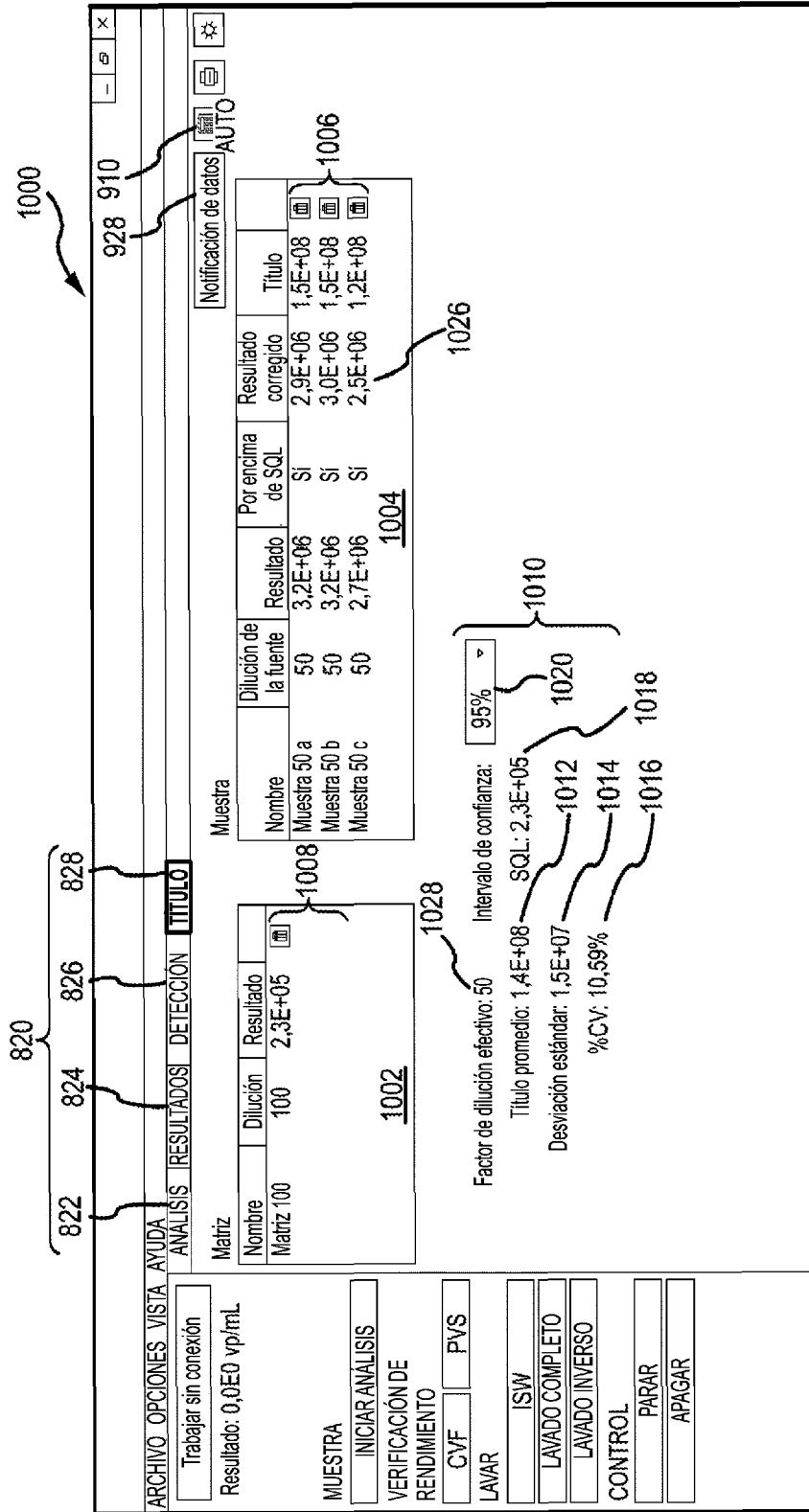


Figura 16

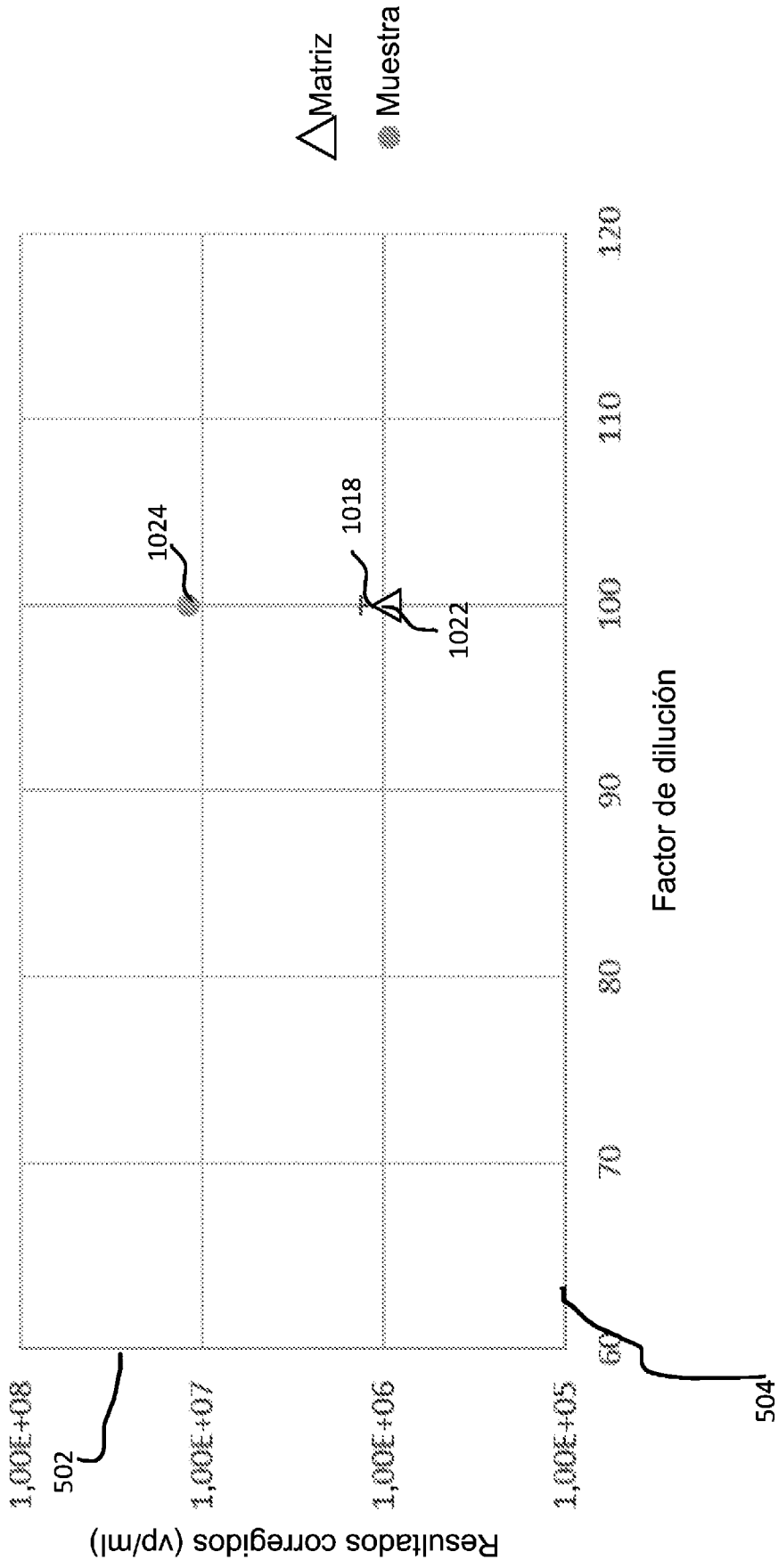


Figura 17