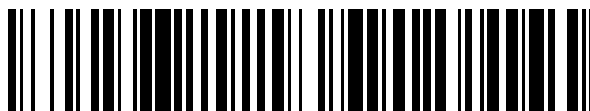


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 731**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2009 E 09175778 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2187199**

54 Título: **Método de configuración de un instrumento para un analizador de fluorescencia**

30 Prioridad:

**13.11.2008 US 199312 P**  
**15.10.2009 US 252001**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.09.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**YAN, MING;**  
**STALL, ALAN M.;**  
**TROTTER, JOSEPH T. y**  
**HOFFMAN, ROBERT A.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 422 731 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de configuración de un instrumento para un analizador de fluorescencia

5 Antecedentes de la Invención

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a instrumentos para analizar una multiplicidad de colorantes fluorescentes usando una multiplicidad de fotodetectores. La presente invención es particularmente aplicable al campo de la citometría, más particularmente, la citometría de flujo o de barrido.

Descripción de la técnica relacionada

Los analizadores de partículas, tales como citómetros de flujo y de barrido, son bien conocidos en la técnica. En estos sistemas, las partículas marcadas con fluorescencia, tales como moléculas, perlas unidas a analito, o células individuales, se analizan individualmente exponiendo cada partícula a una luz de excitación, típicamente uno o más láseres, y midiendo la fluorescencia resultante desde cada una de las marcas de colorante. Cada partícula puede ser marcada con una multiplicidad de colorantes fluorescentes espectralmente distintos. Típicamente, la detección se lleva a cabo usando una multiplicidad de fotodetectores, uno para cada colorante distinto a detectar. Ambos citómetros de flujo y de barrido están disponibles comercialmente, por ejemplo, en BD Biosciences (San José, CA).

Se conocen otros sistemas de instrumentos que son capaces de detectar una multiplicidad de colorantes fluorescentes usando una multiplicidad de fotodetectores. Por ejemplo, los productos de reacción de la amplificación de ácidos nucleicos a partir de múltiples secuencias diana pueden ser detectados y distinguidos usando sondas marcadas con fluorescencia, en las que cada sonda específica de diana está unida a un colorante espectralmente distinto. Típicamente, un instrumento para analizar los productos de amplificación de ácidos nucleicos mide la fluorescencia total desde una mezcla de reacción, y la frecuencia de cada especie diana es determinada a partir de la fluorescencia medida desde cada colorante.

En los citómetros de flujo y otros instrumentos que emplean una multiplicidad de fotodetectores para detectar una multiplicidad de colorantes, la luz recogida es separada en intervalos específicos de longitudes de onda, típicamente por un sistema de filtros dependientes de la frecuencia y espejos dicróicos, de manera que la luz detectada por un fotodetector particular es limitada a un rango predefinido de longitudes de onda, denominado canal de detección. Los canales de detección y los colorantes se seleccionan de manera que el pico del espectro de emisión de cada colorante esté dentro del rango de frecuencias de un canal de detección diferente, es decir, cada canal de detección detecta principalmente la emisión desde un único colorante. Sin embargo, debido a que la amplitud de los espectros de emisión de los colorantes fluorescentes, típicamente, un colorante emitirá fluorescencia en más de un canal de detección y, de esta manera, las mediciones de fluorescencia del colorante no son independientes. La emisión de un colorante en los canales de detección destinados a la detección de otros colorantes es conocida por un número de términos, tales como desbordamiento, superposición espectral de fluorescencia y diafonía.

Los métodos para reducir el efecto de desbordamiento o diafonía en las mediciones de fluorescencia de colorantes son conocidos en la técnica. Dichos métodos implican el ajuste de la señal medida por cada fotodetector en una cantidad calculada para compensar la contribución desde colorantes diferentes al colorante principal a detectar. Los ejemplos en el campo de la citometría de flujo incluyen Bagwell, C.B.; Adams, E.G. "Fluorescence Spectral Overlap Compensation for any Number of Flow Cytometer Parameters", Ann. N.Y. Acad. Sci. 677, 167-184 (1993); Roederer, M. et al., "Eight Color, 10-Parameter Flow Cytometry to Elucidate Complex Leukocyte Heterogeneity", Cytometry 29, 328-339 (1997); y Bigos et al., 1999, Cytometry 36: 36-45. Los paquetes de software de análisis de datos, disponibles comercialmente, tales como WinList<sup>®</sup> (Verity Software House, Topsham, Maine), FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR) y FCS Express (De Novo Software, Los Angeles, CA) permiten una compensación mediante software en los archivos de datos almacenados producidos por un citómetro de flujo. Véase también el documento técnico que describe la BD FACSDiVa<sup>™</sup> Option para el citómetro de flujo BD FACSVantage SE (BD Biosciences, San Jose, CA, disponible en ([www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com))).

En un análisis de citometría de flujo típico, las partículas marcadas suspendidas en un medio líquido se hacen pasar a través de un canal estrecho, de una en una, pasando por una región de interrogación. Las partículas se marcan con uno o más colorantes fluorescentes para facilitar la identificación. Mientras pasan por la región de interrogación, las partículas marcadas son expuestas a la luz de excitación, típicamente, desde uno o más láseres, y se mide la fluorescencia resultante de las partículas. Típicamente, también se mide la cantidad de luz de excitación dispersada por las partículas. La cantidad de luz dispersada y la intensidad de la luz fluorescente emitida desde cada una de las marcas unidas proporcionan una caracterización de las partículas marcadas. La citometría de flujo proporciona un medio rápido para analizar un gran número de partículas y, de manera importante,

proporciona datos sobre cada partícula individual, en lugar de sólo acerca de la población de partículas en su conjunto. Sin embargo, la detección de un bajo nivel de luz emitida por las moléculas de colorante unidas a una única partícula requiere, típicamente, una amplificación de la señal detectada. Para detectar dichos niveles bajos de luz emitida, los citómetros de flujo actuales usan fotodetectores tales como tubos fotomultiplicadores (PMT) y fotodiodos de avalancha (APD) que son capaces de amplificar la señal por un factor de  $10^6$  o mayor. La ganancia de amplificación de un PMT o APD puede ser variada ajustando un voltaje de entrada al detector, o ajustando la ganancia de un amplificador situado aguas abajo, o ambos.

Típicamente los instrumentos para la detección de productos de amplificación de ácidos nucleicos marcados miden los productos marcados a nivel de población, en lugar de a nivel de partículas individuales, y el grado de amplificación requerido de la señal depende del volumen de la muestra analizada. La amplificación de señal, si se usa, puede conseguirse usando un amplificador en línea con la salida del detector. Como con un PMT o APD, típicamente, la ganancia de la amplificación es ajustable.

Antes de llevar a cabo un ensayo particular, usando un citómetro de flujo, la amplificación de la señal del fotodetector (ganancia) y el rango de la señal detectada se ajustan en base al brillo/cantidad de colorantes a detectar con el fin de que las mediciones de las muestras estén dentro del rango dinámico del sistema de detección. Para proporcionar la máxima resolución del nivel de fluorescencia de las muestras, es deseable que la ganancia del fotodetector y el rango de la señal detectada se fijen de manera que el rango esperado de la fluorescencia de la muestra se extienda en una parte considerable del rango detectable. Debido a que el rango esperado de la fluorescencia de la muestra es específico de la muestra, estos parámetros del instrumento deben ser determinados y establecidos antes de analizar cada tipo de muestra. Además, estos parámetros son específicos del instrumento, ya que los instrumentos individuales diferirán en su rendimiento.

Típicamente, la ganancia del fotodetector y el rango de la señal detectada se establecen en un citómetro de flujo analizando muestras de estándares que son representativos de la muestra desconocida a analizar posteriormente. Por ejemplo, antes de analizar una muestra que contiene células, una muestra de perlas o células tintadas con una cantidad de colorante representativa de la luminosidad esperada de una célula tintada con colorante brillante se usa para establecer el extremo superior del rango de detección, o una muestra de perlas o células no marcadas, que emiten fluorescencia a un nivel de una célula de muestra no marcada, se usa para establecer el extremo inferior del rango de detección. Típicamente, esta determinación de los parámetros apropiados se realiza todos los días, incluso si todos los días debe realizarse el mismo tipo de análisis, en parte debido a la variación de un día a otro en el rendimiento del instrumento y del fotodetector.

Debido a que los niveles de ganancia del fotodetector en cada uno de los múltiples fotodetectores afecta a la medición de la luz en cada canal, la cantidad de fluorescencia de desbordamiento medida depende de las ganancias de los fotodetectores. Con el uso de citómetros de flujo actuales, las cantidades relativas de fluorescencia de desbordamiento desde cada uno de los colorantes se determinan experimentalmente una vez elegidos los parámetros de ganancia del fotodetector. Cualquier cambio en los parámetros de ganancia de los fotodetectores del instrumento después de la configuración inicial hace que las mediciones de desbordamiento y, por lo tanto, la compensación, ya no sean aplicables a los parámetros actuales del instrumento. Típicamente, después de cualquier cambio en los parámetros de la ganancia de los fotodetectores del instrumento, el desbordamiento desde los colorantes se vuelve a determinar experimentalmente usando los parámetros actuales del instrumento.

La patente US Nº 6.897.954 describe instrumentos para el análisis de una multiplicidad de colorantes fluorescentes usando una multiplicidad de fotodetectores de amplificación, tales como citómetros de flujo, que son capaces de configurar de nuevo automáticamente los parámetros del instrumento, incluyendo los valores de desbordamiento y de compensación, después de un cambio en la amplificación de los fotodetectores. Para habilitar la realización de un nuevo cálculo de los parámetros después de un cambio en la amplificación de los fotodetectores, el instrumento almacena representaciones de las relaciones funcionales entre pares entre la fluorescencia medida y la amplificación de señal de los fotodetectores (ganancia de los fotodetectores) para cada uno de los fotodetectores y para cada uno de los colorantes fluorescentes.

#### Compendio de la Invención

La presente invención proporciona un método de determinación de los valores de desbordamiento y de compensación, y de predicción de la emisión de fluorescencia (brillo) del reactivo fluorescente, para su uso con instrumentos para el análisis de una multiplicidad de colorantes fluorescentes usando una multiplicidad de fotodetectores. El método usa los valores predeterminados de "desbordamiento calibrado", definidos en la presente memoria, para simplificar la configuración del instrumento. Estos valores de desbordamiento calibrados están predeterminados para cada reactivo fluorescente marcado con un colorante fluorescente diferente de las emisiones de fluorescencia medidas desde el colorante en cada canal del detector, calibrados usando las emisiones de

fluorescencia de un material de referencia "de banda ancha" que emite en cada uno de los canales. Durante la configuración del instrumento, los valores de desbordamiento o de compensación aplicables a los parámetros del instrumento particular a usar en un ensayo, que pueden ser diferentes de los usados para obtener los valores de desbordamiento o compensación calibrados predeterminados, se obtienen midiendo las emisiones de fluorescencia de un material de referencia igual o equivalente con los parámetros del instrumento particular, y calculando los valores de desbordamiento o de compensación del reactivo a partir de las emisiones medidas del material de referencia y los valores de desbordamiento o de compensación calibrados predeterminados. De manera similar, el brillo esperado de un reactivo fluorescente que tiene un valor de emisión de fluorescencia calibrado predeterminado se obtiene midiendo la emisión de fluorescencia del material de referencia con los parámetros del instrumento particular, y calculando el brillo esperado del reactivo a partir de las emisiones medidas del material de referencia y el brillo predeterminado calibrado del reactivo.

Los valores de desbordamiento calibrados de un colorante fluorescente se obtienen a partir de las emisiones de fluorescencia desde el colorante medidas en un canal secundario (desbordamiento) y en el canal primario, calibrando cada valor de emisión usando la emisión de fluorescencia de un material de referencia medida en el canal del detector correspondiente, ambas medidas con los mismos parámetros del instrumento. Los valores de desbordamiento calibrados de la presente invención son independientes de las ganancias del fotodetector, a diferencia de los valores de desbordamiento no calibrados, medidos directamente, usados para determinar la compensación. Esta independencia de la ganancia permite que los valores de desbordamiento calibrados sean obtenidos en cualquier momento antes de configurar el instrumento para un ensayo particular, usando parámetros de ganancia del fotodetector que pueden ser significativamente diferentes de los usados para el ensayo final.

La compensación de los datos medidos durante un ensayo requiere valores de desbordamiento no calibrados que son específicos para los parámetros de ganancia del fotodetector particular usado en el ensayo. En los métodos de la presente invención, estos valores de desbordamiento no calibrados se obtienen midiendo la emisión de fluorescencia en cada uno de los canales del detector del material de referencia, con los parámetros de ganancia del fotodetector a usar en el ensayo, y calculando los valores de desbordamiento no calibrados a partir de los valores de desbordamiento calibrados predeterminados y las emisiones de fluorescencia medidas desde el material de referencia. A continuación, los valores de compensación se obtienen a partir de los valores de desbordamiento. Esto simplifica la configuración del instrumento para el usuario final, ya que sólo se necesita analizar el material de referencia con los parámetros de ganancia del fotodetector del instrumento específico del ensayo.

Los valores de intensidad de fluorescencia (brillo) no calibrados de los reactivos de ensayo pueden ser útiles para ayudar a establecer los parámetros de ganancia del fotodetector de manera que los datos obtenidos a partir de los reactivos estarán "en la escala" o dentro del rango dinámico del instrumento. El brillo de un reactivo de ensayo con un parámetro de ganancia del fotodetector determinado es estimado por la medición de fluorescencia, no calibrada, dependiente de la ganancia obtenida a partir de la medición de fluorescencia calibrada, independiente de la ganancia, y la fluorescencia del material de referencia medida con el parámetro de ganancia del fotodetector determinado. Este aspecto de la invención puede ser usado para establecer los parámetros de ganancia del fotodetector de manera que el brillo de un reactivo coincida con un valor de brillo objetivo predeterminado. Durante la configuración del instrumento, la ganancia del fotodetector es ajustada de nuevo después de medir el material de referencia de manera que el brillo esperado del reactivo coincida con el valor objetivo. Un valor objetivo predeterminado, específico para cada lote de reactivo fabricado, puede ser proporcionado por el fabricante del reactivo para simplificar la configuración del instrumento.

El material de referencia consiste en una o más poblaciones de partículas que, en conjunto, emiten en cada uno de los canales de detección (por lo tanto, "banda ancha"). En una realización preferida, el material de referencia consiste en una única población de micropartículas tintadas con múltiples colorantes fluorescentes, de manera que cada micropartícula emite en cada uno de los canales de detección. De manera alternativa, el material de referencia puede comprender múltiples poblaciones, cada una tintada con uno o más colorantes fluorescentes. La fluorescencia de las diferentes poblaciones puede ser medida de manera independiente analizando las poblaciones por separado, o combinando las poblaciones y analizando la mezcla. Mediante el uso de un citómetro de flujo, por ejemplo, pueden distinguirse micropartículas de diferentes poblaciones mediante una selección de poblaciones apropiada basada en las intensidades medidas o las propiedades de dispersión.

La presente invención permite una serie de características novedosas útiles que son particularmente ventajosas para la producción comercial y la distribución de los reactivos fluorescentes, tales como reactivos de citometría de flujo. Estas características novedosas son las siguientes.

El cálculo de la compensación para cualquier conjunto determinado de parámetros de ganancia del fotodetector puede obtenerse a partir de la medición de sólo el material de referencia con los parámetros de ganancia del fotodetector determinado.

El re-cálculo de la compensación después de cambiar uno o más parámetros de ganancia del fotodetector puede ser obtenido a partir de la medición de sólo el material de referencia con los nuevos parámetros.

5 El establecimiento de una ganancia de PMT para obtener un brillo deseado para un reactivo particular, de manera que los datos obtenidos a partir del reactivo estén "en la escala" o dentro del rango dinámico del instrumento, puede ser obtenido a partir de la medición de solo el material de referencia. Los valores de brillo objetivo predeterminado pueden ser proporcionados junto con el reactivo, además de los valores de fluorescencia calibrados, para facilitar la configuración del instrumento.

10 Los valores de emisión calibrados para cada colorante en un ensayo multiplex, que se usan para obtener los valores de desbordamiento calibrados, pueden ser determinados en momentos diferentes y con parámetros de ganancia diferentes del fotodetector. Para cada colorante, los valores calibrados se obtienen a partir de la fluorescencia del colorante y la fluorescencia del material de referencia, medida con los mismos parámetros de ganancia del fotodetector, pero no es necesario que los parámetros de ganancia de los fotodetectores usados para obtener los valores calibrados para un colorante sean los mismos que los usados para otros colorantes. Este aspecto de la invención simplifica la combinación de reactivos tintados para su uso en un ensayo multiplex.

15 La sustitución de un nuevo colorante para uno de los colorantes de un conjunto existente de colorantes usados en un ensayo multiplex requiere sólo la medición de los valores de emisión calibrados para el nuevo colorante, que se obtienen a partir de la fluorescencia del nuevo colorante y la fluorescencia del material de referencia medida con los mismos parámetros de ganancia del fotodetector. No es necesario que estos parámetros de ganancia del fotodetector sean los mismos parámetros usados para obtener los valores calibrados para cada uno de los otros colorantes. Este aspecto de la invención simplifica la sustitución de un colorante en un ensayo multiplex.

20 La sustitución de un nuevo lote de reactivos para un lote de reactivos anterior se simplifica. Un nuevo lote de reactivos puede tener valores de desbordamiento diferentes, en algunos casos, considerablemente diferentes. Los valores de desbordamiento calibrados obtenidos para el nuevo lote de reactivos permiten la sustitución directa del nuevo lote para el lote antiguo sin necesidad de validar de nuevo el lote de reactivos.

25 La sustitución de un nuevo material de referencia, o lote del mismo material de referencia, se simplifica. Las emisiones calibradas del nuevo material de referencia con respecto al antiguo material de referencia permiten un cálculo directo o nuevo cálculo de los valores de desbordamiento y de emisión del reactivo, calibrados y no calibrados, con respecto al nuevo material de referencia. De esta manera, la sustitución de un nuevo material de referencia o lote de material de referencia no requiere un nuevo cálculo de los valores de desbordamiento calibrados para los reactivos de ensayo.

30 En una realización preferida, el instrumento es un citómetro de flujo. Sin embargo, la presente invención es aplicable a cualquier instrumento para analizar una multiplicidad de colorantes fluorescentes en una multiplicidad de canales del detector, en los que se desea la compensación, es decir, en los que el solapamiento espectral de los espectros de emisión de colorante resulta en uno o más de los canales del detector que miden la luz desde más de un colorante. Aunque la presente invención es más aplicable a instrumentos que tienen fotodetectores de ganancia ajustable, por ejemplo, tubos fotomultiplicadores (PMT), la presente invención es aplicable también a instrumentos que tienen fotodetectores con ganancia prefijada o sin ganancia. En general, los instrumentos indicados para tener una ganancia del fotodetector no ajustable todavía exhibirán una variación en la respuesta del fotodetector, de un instrumento a otro, que afecta a la compensación requerida. Además, conforme un instrumento envejece, se espera que la respuesta del fotodetector pueda cambiar con el tiempo, lo que puede afectar a la compensación requerida.

#### Descripción detallada de la Invención

35 Las siguientes definiciones se proporcionan por razones de claridad. A menos que se indique lo contrario, todos los términos se usan en el sentido normal de la técnica.

40 Tal como se usa en la presente memoria, "sistema" e "instrumento" pretende abarcar tanto el hardware (por ejemplo, mecánico y electrónico) como componentes de software asociados (por ejemplo, programas informáticos).

55 La presente invención es más aplicable a instrumentos que tienen múltiples fotodetectores, cada uno con una amplificación de señal ajustable, denominada también como ganancia. No es crítico si la ganancia del fotodetector es proporcionada solo por un fotodetector o por un amplificador de señal que amplifica la salida del fotodetector. Por esta razón, "fotodetector" se usa en la presente memoria para hacer referencia a un fotodetector individual o a un fotodetector con un amplificador o amplificadores de señal adjuntos, si están presentes. Por ejemplo, la señal desde un fotodiodo, que tiene una respuesta intrínseca fija, o un fotodiodo de avalancha, que tiene una amplificación ajustable, pero que se usa, típicamente, a un nivel de amplificación fijo, puede hacerse pasar a través

de un amplificador de señal lineal o logarítmico proporcionando una ganancia ajustable; en este caso, la ganancia del fotodetector se refiere a la amplificación proporcionada por la combinación del fotodiodo y el amplificador de señal. En realizaciones preferidas, se usan tubos fotomultiplicadores, que proporcionan amplificación de la señal. Sin embargo, puede usarse una amplificación adicional de la salida del fotodetector. Por ejemplo, en el BD FACSDiVa™ Option para el citómetro de flujo BD FACSVantage™ SE (ambos de BD Biosciences, San Jose, CA), las señales desde los tubos fotomultiplicadores son pasadas través de un pre-amplificador antes de ser convertidas a una señal digital por un convertidor analógico-digital.

La amplificación de la señal (ganancia) del fotodetector se ajusta durante la configuración del instrumento ajustando uno o más parámetros. Por ejemplo, el nivel de voltaje de entrada de un PMT es un parámetro que se usa para ajustar la amplificación de la señal de un PMT, y es el parámetro que se ajusta durante la configuración del instrumento. Como otro ejemplo, en el caso en el que los fotodiodos o fotodiodos de avalancha están conectados a un amplificador ajustable aguas abajo, el parámetro usado para ajustar la amplificación de la señal del amplificador aguas abajo es el parámetro que se ajusta durante la configuración del instrumento. Por conveniencia, el valor del parámetro usado para establecer la ganancia del fotodetector será referido, indistintamente, como la ganancia del fotodetector, como es habitual en la técnica. De esta manera, por ejemplo, el voltaje de entrada de un PMT (o, simplemente, el voltaje de PMT) será usado como la medida de la ganancia de PMT.

Aunque la presente invención es más aplicable a instrumentos que tienen fotodetectores con ganancia ajustable, la presente invención es aplicable también a instrumentos que tienen fotodetectores con ganancia prefijada o sin ganancia. En general, los instrumentos diseñados para tener una ganancia no ajustable del fotodetector todavía exhibirán una variación en la respuesta del fotodetector, de un instrumento a otro, que afecta a la compensación requerida. Además, conforme un instrumento envejece, se espera que la respuesta del fotodetector pueda cambiar con el tiempo, lo que puede afectar a la compensación requerida. Los presentes métodos son igualmente adecuados para determinar la compensación requerida en cada caso.

Un "canal del detector", "canal de detección" o "canal" se refiere al rango de longitudes de onda que es detectado por un fotodetector específico. Típicamente, se miden una pluralidad de canales no superpuestos del detector para facilitar la medición independiente de una pluralidad de colorantes fluorescentes, espectralmente distintos. Típicamente, el rango de longitudes de onda detectadas es determinado por el uso de filtros dependientes de la frecuencia y/o espejos dicróicos, tal como es bien conocido en la técnica. En aras de una mayor claridad, el uso en la presente memoria del término "canal" se distingue de un uso secundario en el campo de la citometría de flujo para hacer referencia a una subdivisión discreta del rango de valores de intensidad detectables por un único detector.

Típicamente, los colorantes y los canales del detector se seleccionan de manera que, tanto como sea posible, el máximo de la emisión de cada colorante esté dentro de un canal diferente del detector, es decir, de manera que cada colorante corresponda a un canal del detector optimizado para detectar la luz desde ese colorante. Sin embargo, debido a la amplitud de su espectro de emisión, la luz desde un colorante determinado puede ser emitida dentro de uno o más de otros canales del detector. La luz emitida por un colorante dentro de un canal de detector diferente al canal del detector que se corresponde más cercanamente con el máximo de emisión del colorante se denomina, en la presente memoria, "desbordamiento".

El canal del detector que se corresponde más cercanamente con el máximo de la emisión de un colorante se denomina, en la presente memoria, con referencia al colorante determinado, canal de detección de colorante o canal primario. Con referencia al colorante determinado, el resto de canales del detector se denominan canales de desbordamiento o canales secundarios. Un colorante y su canal de detección de colorante se denominarán como "correspondientes" o "emparejados". Con referencia a un canal de detección, el colorante que se corresponde con el canal de detección se conoce como el colorante primario; otros colorantes que emiten desbordamiento en el canal de detección se conocen como colorantes secundarios.

Se entenderá que la correspondencia de un colorante primario y un canal del detector depende del conjunto de colorantes usados en el ensayo y los canales del detector usados. Típicamente, en un ensayo multiplex, cada colorante es medido en un detector primario particular, que mide la luz sobre un rango de longitudes de onda diferente. Sin embargo, en algunas realizaciones, los detectores primarios para dos colorantes diferentes pueden medir la luz sobre rangos de frecuencias superpuestos, o incluso idénticos, si las emisiones de los colorantes son separables espacialmente. Por ejemplo, en relación al uso de un instrumento que tiene múltiples fuentes de excitación, tal como un citómetro de flujo que tiene múltiples láseres de excitación enfocados sobre regiones separadas espacialmente de la corriente de flujo, se usan conjuntos separados de detectores para medir la fluorescencia emitida después de la excitación con cada uno de los láseres. Con dichos instrumentos, pueden usarse colorantes que tienen diferentes desplazamientos Stokes, de manera que los colorantes tienen espectros de emisión similares, pero espectros de excitación diferentes, que son excitables usando láseres diferentes.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "partículas" se refiere a partículas sintéticas, tales como micropartículas o perlas, y a partículas derivadas de fuentes biológicas, tales como células eucariotas, bacterias, virus o macromoléculas.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "micropartículas", "microesferas" y "perlas" se usan indistintamente. Estos términos se refieren a pequeñas partículas con un diámetro en el rango de nanómetros a micrómetros, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,000  $\mu\text{m}$  de diámetro, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 100  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de aproximadamente 1 a 100  $\mu\text{m}$  y, para su uso en citometría de flujo, típicamente, de aproximadamente 1 a 10  $\mu\text{m}$ . Las micropartículas pueden ser de cualquier forma pero, típicamente, son aproximadamente esféricas ("microesferas"). Típicamente, las micropartículas son partículas sintéticas, pero también pueden derivarse a partir de partículas biológicas, tales como células eucariotas, bacterias, virus o macromoléculas.

Tal como se usa en la presente memoria, una "población" de partículas se refiere a un grupo de partículas que poseen esencialmente las mismas propiedades ópticas con respecto a los parámetros a medir, tales como células del mismo tipo (población de células), o perlas sintetizadas que, dentro de las tolerancias prácticas de fabricación, son del mismo tamaño, forma y composición (población de perlas). Las perlas pueden consistir en partículas de cualquier forma y no tienen que ser esféricas.

El término "IFM", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la intensidad de fluorescencia media o mediana de una población de partículas fluorescentes. Se entenderá que pueden usarse otras medidas estadísticas de la fluorescencia de la población, tales como la media truncada o la mediana truncada de la fluorescencia.

#### Material de referencia

Un "material de referencia", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier sustancia que pueda ser usada para establecer una relación conocida entre una respuesta de medición y un valor de la sustancia que se está midiendo. Los materiales de referencia son estándares que tienen una propiedad de fluorescencia conocida que puede ser usada para establecer la respuesta de un instrumento a un material que tiene la propiedad conocida.

En los presentes métodos, la fluorescencia medida de un colorante o una partícula marcada con colorante en un canal de detección determinado es calibrada usando la fluorescencia medida de un material de referencia que emite en cada uno de los canales del detector, también denominado, en la presente memoria, un material de referencia de banda ancha. Un material de referencia puede contener un número fijo, pero desconocido, de moléculas de colorante por partícula, que es suficiente para medir los valores de fluorescencia relativa, o puede contener un número conocido de moléculas de colorante, en cuyo caso el material de referencia permite además calcular la fluorescencia por molécula de colorante.

El material de referencia consiste en una o más poblaciones de partículas que, en su conjunto, emiten en cada uno de los canales de detección. En una realización preferida, el material de referencia consiste en una única población de micropartículas tintadas con múltiples colorantes fluorescentes, de manera que cada micropartícula emite en cada uno de los canales de detección. De manera alternativa, el material de referencia puede comprender múltiples poblaciones, cada una tintada con uno o más colorantes fluorescentes. La fluorescencia de las diferentes poblaciones puede ser medida de manera independiente analizando las poblaciones por separado, o combinando las poblaciones y analizando la mezcla. Con el uso de un citómetro de flujo, por ejemplo, pueden distinguirse micropartículas de diferentes poblaciones mediante una selección de poblaciones ("gating") apropiada basada en las intensidades medidas o las propiedades de dispersión.

Las micropartículas para uso como un material de referencia pueden estar realizadas en cualquier material apropiado (o sus combinaciones), incluyendo, pero sin limitarse a, polímeros tales como poliestireno, poliestireno que contiene otros co-polímeros tales como divinilbenceno, polimetilmetacrilato (PMMA), poliviniltolueno (PVT), copolímeros tales como estireno/butadieno, estireno/viniltolueno, látex u otros materiales, tales como sílice (por ejemplo,  $\text{SiO}_2$ ).

Las micropartículas adecuadas para su uso en la presente invención son bien conocidas en la técnica y están disponibles comercialmente en un número de fuentes. Las micropartículas no tintadas en una diversidad de tamaños y composiciones de polímeros que son adecuadas para la preparación de micropartículas fluorescentes están disponibles a partir de una variedad de fuentes, incluyendo: Bangs Laboratories (Carmel, Ind.), Interfacial Dynamics Corporation (Portland, Oreg.), Dynal (Great Neck, N.Y.), Polysciences (Warrington, Pa.), Seradyne (Indianapolis, Ind.), Magsphere (Pasadena, Calif.), Duke Scientific Corporation (Palo Alto, Calif.), Spherotech Inc. (Libertyville, Ill.) y Rhone-Poulenc (Paris, Francia). Los monómeros químicos para la preparación de micropartículas están disponibles a partir de numerosas fuentes.

Los colorantes fluorescentes han sido incorporados en micropartículas en una diversidad de maneras, incluyendo, por ejemplo, mediante copolimerización del colorante en las micropartículas durante la fabricación (patente US N° 4.609.689 de Schwartz et al. (1975), patente US N° 4.326.008 de Rembaum (1982)); mediante atrapamiento del colorante fluorescente en las micropartículas durante el procedimiento de polimerización, o mediante incorporación no covalente del colorante fluorescente en micropartículas preparadas previamente (patentes US Nos. 5.326.692; 5.723.218; 5.573.909; 5.786.219 y 6.514.295). El método de marcado de las micropartículas no es un aspecto crítico de la invención; puede usarse cualquier método que permita el marcado de las micropartículas con una cantidad controlable de colorante.

En una realización preferida, las micropartículas marcadas con fluorescencia se preparan mediante un baño de colorante según métodos bien conocidos. Los métodos de baño de colorante se describen, por ejemplo, en las patentes US Nos. 5.326.692, 5.723.218, 5.573.909, 5.786.219 y 6.514.295. Dichas micropartículas preparadas mediante los métodos de baño de colorante se conocen también como perlas tintadas en duro ("hard-dyed").

En una realización preferida, el material de referencia consiste en una única población de micropartículas tintadas con múltiples colorantes fluorescentes, de manera que cada micropartícula emite en cada uno de los canales de detección. Las perlas disponibles comercializadas, tintadas con múltiples colorantes fluorescentes y diseñadas para emitir en múltiples canales del detector incluyen BD™ Cytometer Setup and Tracking beads (CS&T beads, BD Biosciences, San Jose, CA), y perlas de alineación Rainbow and Ultra Rainbow y las partículas de calibración de Spherotech, Inc., Lake Forrest, IL).

Las perlas BD™ Cytometer Setup and Tracking son perlas de poliestireno tintadas con una mezcla de colorantes fluorescentes. Las perlas emiten fluorescencia en los canales del detector en un rango de 400 a 800 nm, que abarca el rango usado típicamente en los citómetros de flujo BD digitales para la medición de la emisión desde una diversidad de colorantes fluorescentes usados normalmente, incluyendo, por ejemplo, Indo 1, DAPI, Hoechst, Pacific Blue™, AmCyan, Qdot 655, Qdot 700, Alexa Fluor® 405, FITC, PE, PE-Texas Red®, PerCP, PerCP-Cy™5.5, PE-Cy™7, PE, PE-Texas Red®, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, APC-HL 750, Alexa Fluor® 700. Las perlas son útiles como un material de referencia para calibrar la emisión desde cualquiera de los colorantes fluorescentes de la lista u otros colorantes fluorescentes que son detectables usando estos canales de detección o canales de detección definidos de manera similar. Según se requiera, las perlas BD Cytometer Setup and Tracking consisten en una mezcla de concentraciones iguales de perlas claras (3 µm), medias (3 µm) y oscuras (2 µm), cada perla tintada con una mezcla de fluorocromos. Para su uso en la presente invención como un material de referencia, sólo se usan perlas de una única intensidad de emisión. Las diferentes poblaciones de perlas pueden ser distinguidas por su tamaño e intensidad.

En una realización alternativa, el material de referencia puede comprender múltiples poblaciones, cada una tintada con uno o más colorantes fluorescentes. Por ejemplo, el material de referencia puede comprender un conjunto de poblaciones de referencia, una para cada canal del detector, cada uno marcado con el colorante primario para ese canal del detector. Para calibrar las emisiones de fluorescencia en una pluralidad de canales de detección, se usa el conjunto de poblaciones de referencia, de manera que para cada canal, las emisiones en ese canal son calibradas por la emisión desde la partícula de referencia marcada con el colorante primario para ese canal. Los conjuntos de perlas disponibles comercialmente, cada una tintada con un único colorante, incluyen perlas BD FACS® de configuración de 7 colores y perlas BD Calibrite®, ambas disponibles en BD Biosciences (San José, California).

Las perlas BD FACS de configuración de 7 colores incluyen poblaciones de perlas empaquetadas por separado, cada una de ellas no marcada o marcada con un fluoróforo. En conjunto, las poblaciones de perlas están marcadas con los colorantes siguientes: fluoresceína (FITC), R-ficoeritrina (PE), proteína clorofila peridina (PerCP); tándem PerCP cianina 5.5 (PerCP-Cy® 5.5); tándem PE cianina 7 (PE-Cy7); alofocianina (APC) o tándem APC cianina 7 (APC-Cy7). Las perlas BD Calibrite® (BD Biosciences, San Jose, California) incluyen perlas marcadas con FITC, perlas marcadas con PE, perlas marcadas con PerCP y perlas marcadas con APC.

Aunque las micropartículas sintéticas tintadas con múltiples colorantes son preferidas, las partículas de referencia pueden ser realizadas usando otros tipos de partículas, incluyendo partículas biológicas. Por ejemplo, los materiales de referencia pueden consistir en poblaciones de células tintadas con anticuerpos marcados con colorante específicos a un marcador de superficie celular que se expresa en un nivel consistente, de manera que las células son marcadas con un número medio consistente de anticuerpos unidos para cada célula. Para cada canal de detección determinado, se prepara una población de referencia correspondiente al canal mediante la tinción de una muestra de las células con un anticuerpo marcado con el colorante primario para ese canal. De esta manera, se produce un material de referencia que consiste en un conjunto de poblaciones de referencia, uno correspondiente a cada canal de detección, tintando las muestras de células por separado con un anticuerpo



marcado con un colorante primario para uno de los canales de detección.

En general, el material de referencia puede comprender partículas de cualquier tipo que contengan, o estén marcadas con, un número consistente de moléculas de colorante por partícula, y sean adecuadas para ser medidas usando el instrumento. Para su uso con un citómetro de flujo, puede usarse una diversidad de partículas basadas en células o basadas en perlas sintéticas. Típicamente el material de referencia se usa múltiples veces en los presentes métodos, inicialmente para calibrar los valores de desbordamiento medidos, y, posteriormente, para calcular los valores de desbordamiento no calibrados a partir de los valores de desbordamiento calibrados determinados anteriormente. Debido a que puede transcurrir un tiempo considerable entre los usos del material de referencia, la estabilidad o la reproducibilidad de las emisiones de fluorescencia del material de referencia es una propiedad deseable.

#### Estándares de fluorescencia

Tal como se describe más completamente a continuación, los valores de desbordamiento y otras propiedades de fluorescencia de un reactivo de ensayo marcado con colorante se determinan, típicamente, de manera empírica usando una partícula estándar marcada con el mismo colorante. En general, el espectro de emisión y, por lo tanto, el desbordamiento, de un colorante es alterado cuando el colorante es conjugado con un reactivo de detección o es usado para marcar una partícula, y el desbordamiento real del colorante cuando es usado en el ensayo puede diferir del desbordamiento determinado usando una partícula estándar. Es deseable usar una partícula estándar que exhiba propiedades de fluorescencia que se aproximen mucho a las propiedades de fluorescencia del colorante cuando es usado en el ensayo, es decir, cuando se une a un anticuerpo que, a su vez, se une a una célula y en las condiciones de ensayo finales. Las partículas estándar que están diseñadas para presentar propiedades de fluorescencia que se aproximan mucho a las propiedades de fluorescencia de los reactivos de ensayo marcados con colorante se denominan, en la presente memoria, estándares "espectralmente coincidentes" o estándares "de fluorescencia". Dichos estándares son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen los estándares de fluorescencia realizados a partir de perlas de sintéticas marcadas con colorante o a partir de células tintadas.

Los estándares de fluorescencia realizados a partir de micropartículas sintéticas marcadas con colorante han sido ampliamente usados. Por ejemplo, se han usado partículas estándar que consistían en perlas de tintadas en duro y partículas estándar que consistían en perlas sintéticas revestidas con un antígeno a las que se unen anticuerpos específicos de antígeno, marcados con colorante. Las perlas tintadas en duro tienen la ventaja de exhibir propiedades de fluorescencia estables, pero es posible que el desbordamiento medido no represente de manera precisa el desbordamiento real desde el colorante usado bajo las condiciones de ensayo. Las partículas estándar que consisten en perlas sintéticas revestidas con un antígeno a las que se han unido anticuerpos específicos de antígeno, marcados con colorante, pueden coincidir más estrechamente con los reactivos de ensayo, ya que en ambos casos el colorante está unido a un anticuerpo. Sin embargo, el uso de una micropartícula sintética revestida con un antígeno, en lugar de una célula que expresa el antígeno, todavía puede resultar en valores de desbordamiento medidos que difieren del desbordamiento exhibido en las condiciones finales del ensayo.

Para ajustar más estrechamente las propiedades de fluorescencia del reactivo de ensayo marcado con colorante, tal como se usa en un ensayo, es preferible usar estándares de fluorescencia que consisten en poblaciones de células tintadas, donde las células son tintadas marcando un antígeno de la superficie celular expresado con un anticuerpo específico de antígeno marcado con el colorante. Se producen un conjunto de estándares de fluorescencia, uno para cada uno de los diferentes colorantes fluorescentes usados en un ensayo multiplex, tintando por separado las muestras de células con el mismo anticuerpo, pero marcadas con un colorante diferente.

En una realización más preferida, los estándares de fluorescencia consisten en linfocitos CD4<sup>+</sup> en sangre entera fija, preferiblemente humana, marcados con un anticuerpo específico de CD4, marcado con colorante. Un conjunto de estándares de fluorescencia es producido usando diferentes lotes del anticuerpo específico de CD4, cada lote marcado con un colorante primario para uno de los canales de detección. Debido a que la sangre entera está fácilmente disponible, el uso de sangre entera fija en la preparación de estándares de fluorescencia permite al usuario final producir, de manera independiente, estándares de fluorescencia que son equivalentes a los estándares de fluorescencia usados para obtener los valores de desbordamiento calibrados predeterminados.

Una característica ventajosa del uso de los estándares de fluorescencia que consisten en linfocitos CD4<sup>+</sup> en sangre humana fija, marcados con anticuerpos específicos de células CD4, marcados con colorante, es la consistencia del nivel de expresión de las células CD4. Un análisis cuidadoso usando estándares de anticuerpos anti-CD4 marcados con PE y estándares BD Quantibrite<sup>®</sup> (BD Biosciences, San Jose, CA) muestra que hay aproximadamente 40.000 anticuerpos unidos por cada linfocito CD4<sup>+</sup> en sangre humana fija, y que este número es consistente entre las muestras. Este nivel consistente de la expresión de CD4 en linfocitos CD4<sup>+</sup> en sangre humana fija permite la creación de partículas con una fluorescencia estándar que contienen un número consistente de moléculas de colorante y, de esta manera, exhiben un nivel de brillo consistente. Esta propiedad de los estándares permite que

se asigne un valor de intensidad de fluorescencia a las partículas.

Para producir partículas estándar basadas en linfocitos CD4<sup>+</sup> que proporcionen un nivel de intensidad de fluorescencia consistente, los anticuerpos anti-CD4 se marcan con un número promedio consistente de moléculas de colorante por anticuerpo. Tal como se describe a continuación, el nivel de intensidad de fluorescencia puede usarse para proporcionar una medida arbitraria, pero fija, de la intensidad de la fluorescencia de un reactivo. Para este propósito, el número real de moléculas de colorante por anticuerpo, caracterizado típicamente como la relación de colorante a proteína, no es crítico. Además, no es necesario que las partículas con fluorescencia estándar usadas para medir las emisiones de diferentes colorantes sean marcadas con anticuerpos que tienen el mismo número de moléculas de colorante por anticuerpo.

Compensación

El término compensación se refiere al procedimiento de eliminar, de manera efectiva, de la cantidad total de luz detectada dentro de un canal del detector la contribución debida al desbordamiento desde colorantes diferentes al colorante primario, es decir, la contribución desde los colorantes secundarios. De esta manera, tras la compensación, la cantidad de luz detectada desde un único canal del detector representa una medida de la luz emitida por un único colorante, específicamente, el colorante primario. La compensación facilita el análisis de los datos de las partículas tintadas haciendo que las mediciones de cada uno de los colorantes sean independientes.

Para ayudar en la comprensión de la invención, se describen los principios generales de compensación para un instrumento que tiene n canales para la detección de n colorantes. Se supone que los n canales y los n colorantes están numerados de manera que el canal de detección primario para cada colorante tiene el mismo número que el colorante (por ejemplo, el canal 2 se usa para detectar el colorante 2). Numerados de esta manera, el desbordamiento es la fluorescencia de colorante medida por un canal del detector que tiene un número diferente. Este esquema de numeración se elige en aras de la conveniencia y de la elegancia de la presentación y no es un aspecto crítico para la invención.

O<sub>i</sub> indica la fluorescencia total medida (observada) en el i-ésimo canal del detector, que es la suma de las fluorescencias individuales medidas desde cada colorante. D<sub>j</sub> indica la fluorescencia del colorante j medida en el detector j, es decir, la fluorescencia medida por el canal emparejado del detector. Entonces, la fluorescencia del j-ésimo colorante, medida en el canal i-ésimo puede escribirse como (S<sub>ij</sub>\*D<sub>j</sub>), donde a<sub>ij</sub>, al que se hace referencia como coeficiente de desbordamiento, es la fracción relativa de D<sub>j</sub> detectada en el canal i. Por definición, S<sub>ii</sub> = 1. La fluorescencia total medida en el i-ésimo canal del detector puede escribirse como

$$O_i = \sum S_{ij} \cdot D_j, \quad (1)$$

en la que la suma se extiende a los n colorantes detectados. La Ecuación (1) proporciona un sistema de n ecuaciones, una para cada canal del detector.

La compensación se usa para determinar la fluorescencia de cada colorante en su canal de detector de colorante emparejado (cada D<sub>j</sub>) a partir de la fluorescencia total medida en cada canal, que incluye las contribuciones del desbordamiento de colorante. La compensación se realiza resolviendo simultáneamente el sistema de ecuaciones para los D<sub>j</sub>. Debería observarse que, en un sistema sin desbordamiento, en el que la emisión de cada colorante es detectada solo por su canal de detección de colorante, la Ecuación (1) se simplifica a O<sub>i</sub> = D<sub>i</sub> para todo i, y no es necesaria ninguna compensación.

En aras de la compacidad, el sistema de ecuaciones anterior, y las matemáticas de corrección de compensación se describen en la presente memoria usando álgebra matricial. Sin embargo, será evidente que esta representación es por conveniencia y claridad de la presentación y que pueden usarse otras representaciones del sistema de ecuaciones y son equivalentes. En particular, será evidente que una implementación en software sólo necesita llevar a cabo cálculos equivalentes, pero que los detalles de una implementación en software no son un aspecto crítico de la invención.

Sea **O** el vector columna n x 1 de las mediciones de fluorescencia en cada uno de los n canales, es decir, **O** = [O<sub>1</sub>, .... O<sub>n</sub>]<sup>T</sup>. **O** representa el vector de mediciones no compensadas, observadas. Sea **D** el vector columna n x 1 de fluorescencia de colorante para cada uno de los n colorantes, es decir, **D** = [D<sub>1</sub>, .... D<sub>n</sub>]<sup>T</sup>. **D** representa el vector de mediciones compensadas. Sea **S** la matriz n x n de coeficientes de rebosamiento, S<sub>ij</sub>. Entonces, el sistema de ecuaciones representado por la Ecuación (1) puede escribirse en forma matricial como

$$\mathbf{O} = \mathbf{S} \cdot \mathbf{D} \quad (2)$$

y los valores de fluorescencia, compensados,  $\mathbf{D}$ , se obtienen multiplicando por la izquierda ambos lados de la ecuación anterior con la inversa de la matriz de desbordamiento,

$$\mathbf{S}^{-1} \cdot \mathbf{O} = \mathbf{D}. \quad (3)$$

La inversa de la matriz de desbordamiento se denomina matriz de compensación.

La matriz de desbordamiento puede ser estimada midiendo la fluorescencia de un único colorante en cada canal del detector, y repitiendo esta operación para cada colorante. Las mediciones del mismo colorante, medidas usando un estándar de fluorescencia, en cada canal del detector corresponden a una columna de la matriz de desbordamiento. Las medidas de fluorescencia en cada columna son normalizadas dividiendo por la fluorescencia medida en el canal de detección primario para obtener los coeficientes de rebosamiento relativos. Debido al orden elegido de los canales y los colorantes, la matriz de desbordamiento resultante tiene unos en la diagonal ( $S_{ii} = 1$ ) y los coeficientes no diagonales corresponden al desbordamiento relativo en los canales del detector destinados a la medición de colorantes diferentes.

En la descripción anterior de la compensación, se supone que la fluorescencia de cada colorante es medida directamente. Sin embargo, en algunas realizaciones, particularmente en las que el instrumento es un citómetro de flujo, sólo las partículas dentro de un intervalo determinado de tamaños son medibles y las moléculas de colorante deben estar unidas a una partícula de un tamaño adecuado para ser medibles. En la práctica, la fluorescencia de un colorante es medida en un citómetro de flujo usando un estándar de fluorescencia que consiste en una población de perlas o células marcadas con una cantidad uniforme de colorante y midiendo la fluorescencia del estándar de fluorescencia. Sin embargo, las perlas o las células no marcadas pueden emitir fluorescencia en uno o más de los canales del detector. Esta fluorescencia de perlas o células no marcadas, denominada autofluorescencia, eleva el nivel de fondo de la fluorescencia detectada en cada canal. La autofluorescencia puede ser determinada midiendo la fluorescencia de una población de partículas no marcadas en cada canal del detector. Para obtener una estimación precisa de la verdadera fluorescencia desde cada colorante, la autofluorescencia desde la partícula a la que se une el colorante puede ser restada de las intensidades de fluorescencia medidas antes de estimar la matriz de desbordamiento. La compensación que tiene en cuenta la autofluorescencia se describe en la patente US Nº 6.897.954. En la citometría de flujo, típicamente, la autofluorescencia es ignorada durante la adquisición de datos desde las muestras.

A fin de facilitar las descripciones de la matriz de desbordamiento, debido a que los coeficientes dentro de una única columna de la matriz de desbordamiento corresponden a la fluorescencia medida desde la misma población de partículas tintadas en cada uno de los canales, se hará referencia a una única columna de la matriz de desbordamiento como correspondiente a un colorante particular. De manera similar, debido a que los coeficientes dentro de una única fila de la matriz de desbordamiento corresponden a la fluorescencia medida desde diferentes poblaciones de partículas tintadas en un único canal, se hará referencia a una única fila de la matriz de desbordamiento como correspondiente al fotodetector. Se hará referencia a la matriz de compensación de la misma manera. De esta manera, se hará referencia a la misma columna en la matriz de compensación y la matriz de desbordamiento como correspondientes al mismo colorante particular, y se hará referencia a la misma fila en la matriz de compensación y la matriz de desbordamiento como correspondientes al mismo fotodetector particular.

#### Medición de valores de desbordamiento

Los métodos típicos para la configuración de un citómetro de flujo incluyen una determinación empírica de los valores de desbordamiento (coeficientes) para cada colorante, determinados después de establecidas las ganancias de los fotodetectores. En la práctica, esta determinación empírica se realiza, típicamente, usando estándares de fluorescencia diseñados para aproximarse mucho a las propiedades de fluorescencia de los colorantes, tal como se usan en el ensayo. Cuando es evidente por el contexto, el desbordamiento desde un colorante y el desbordamiento desde un colorante tal como se mide usando una población de partículas o de perlas marcadas uniformemente (tintadas) con el colorante se usarán en la presente memoria de manera intercambiable.

Para determinar los valores de desbordamiento para un colorante determinado, la fluorescencia de una muestra de una población de partículas marcadas uniformemente con el colorante se mide en cada canal de detección. El valor de desbordamiento del colorante en un canal de detección secundario se calcula como la relación de la emisión

medida de las partículas marcadas en el canal secundario a la emisión medida en el canal primario, es decir, la relación entre la IFM de las partículas marcadas en el canal secundario a la IFM en el canal primario.

5 Usando la notación introducida anteriormente, el desbordamiento del j-ésimo colorante en el i-ésimo canal de detección (secundario),  $S_{ij}$ , se calcula como:

$$10 \quad S_{ij} = \frac{IFM_{ij}}{IFM_{jj}}, \quad (4)$$

en la que  $IFM_{ij}$  es la intensidad media de fluorescencia medida desde una población de partículas tintadas con el j-ésimo colorante en el i-ésimo canal del detector (secundario), y  $IFM_{jj}$  es la intensidad media de fluorescencia medida desde la misma población en el j-ésimo canal del detector (primario).

El espectro de emisión de un colorante es una propiedad del propio colorante; la proporción relativa de la emisión total de un colorante que cae dentro de cada canal de detección (es decir, el desbordamiento inherente) es una propiedad del espectro de emisión del colorante. En principio, si las mediciones de fluorescencia en cada canal de detección fueran comparables directamente, el desbordamiento medido de un colorante reflejaría el desbordamiento inherente. Sin embargo, las señales desde los fotodetectores dependen de las ganancias de los fotodetectores que, típicamente, son ajustables y se establecen de manera independiente para cada canal de detección, y las mediciones de fluorescencia desde cada canal de detección no son comparables directamente. Por esta razón, los valores de desbordamiento medidos empíricamente definidos por la Ecuación (4) dependen de las ganancias de los fotodetectores. Típicamente, los cambios en las ganancias de los fotodetectores requieren repetir la determinación experimental de los valores de desbordamiento.

Mediciones calibradas de fluorescencia

30 La intensidad de fluorescencia medida de un colorante, indicada como IFM, depende de la ganancia del fotodetector. Se define una medida calibrada, independiente de la ganancia, de la intensidad de fluorescencia, con referencia a un material de referencia, medida en las mismas configuraciones y condiciones del instrumento, como la relación de la intensidad de fluorescencia medida del colorante a la intensidad de la fluorescencia medida del material de referencia, ambas medidas en el mismo canal del detector.

35 La intensidad de fluorescencia media calibrada en el i-ésimo canal del detector de una población de partículas marcadas con el j-ésimo colorante, indicada como  $ABD_{ij}$ , se define en la presente memoria como:

$$40 \quad ABD_{ij} = C_i \cdot \frac{IFM_{ij}}{IFM_{iref}}, \quad (5)$$

45 en la que  $IFM_{ij}$  es la intensidad media de fluorescencia en el i-ésimo canal del detector de la población de partículas marcadas con el j-ésimo colorante,  $IFM_{iref}$  es la intensidad media de fluorescencia en el i-ésimo canal del detector del material de referencia, y  $C_i$  es una constante.

Los valores de  $C_i$ , una vez asignados, son fijos, aunque los valores numéricos son arbitrarios. Para mayor comodidad, los valores  $C_i$  pueden ser elegidos para reflejar, o para ser proporcionales a, el número medio de anticuerpos marcados con colorante unidos a cada partícula de referencia. Por ejemplo, usando las partículas con fluorescencia estándar basadas en linfocitos  $CD4^+$ , es conveniente establecer  $C_i = 40.000$ , que es el número medio de anticuerpos anti- $CD4$  marcados con colorante unidos por cada linfocito  $CD4^+$  en sangre humana fija. La constante  $C_i$  proporciona una escala a las unidades de emisión de fluorescencia medidas en el canal i del detector. Sin embargo, el valor absoluto no es un aspecto crítico de la invención, y se puede usar otro valor de  $C_i$ . Por ejemplo,  $C_i$  puede ser fijado a 1, en cuyo caso el valor ABD es la fluorescencia medida en una escala en la que la fluorescencia media del material de referencia es 1, o, de manera equivalente, el valor ABD es la fluorescencia como una relación de la fluorescencia de referencia.

60 Siempre que tanto la población de partículas marcadas con colorante como el material de referencia se midan en el rango lineal del fotodetector, de manera que la señal de salida del fotodetector es proporcional al número real de fotones detectados, la fluorescencia calibrada de la población de partículas marcadas con colorante, expresada en unidades ABD, no depende de la ganancia del fotodetector. Los cambios en la ganancia del fotodetector resultarán

en cambios en las intensidades de fluorescencia medidas tanto desde la población de partículas como desde la población de referencia, pero la proporción de las dos se mantendrá constante.

Parámetros de fluorescencia de referencia

La IFM no calibrada medida desde una población con un parámetro de ganancia del fotodetector particular puede obtenerse a partir de la intensidad de fluorescencia media calibrada invirtiendo la Ecuación (5) para obtener

$$IFM_{ij} = \frac{ABD_{ij} \cdot IFM_{iref}}{C_i} \quad (6)$$

De esta manera, se obtiene una medición de fluorescencia no calibrada (IFM<sub>ij</sub>), que depende de los parámetros de ganancia del fotodetector, a partir de una medición de fluorescencia calibrada, independiente de la ganancia (ABD<sub>ij</sub>) mediante la multiplicación con un factor de escala obtenido a partir de la fluorescencia del material de referencia medida con el parámetro de ganancia del fotodetector determinado. El factor de escala para el i-ésimo fotodetector,

$$\frac{IFM_{iref}}{C_i} \quad (7)$$

está indicado en la presente memoria como "la intensidad de fluorescencia de referencia", IFR<sub>i</sub>.

La intensidad de la fluorescencia de referencia proporciona un método conveniente para obtener las intensidades de fluorescencia no calibradas de una población de partículas marcadas para cualquier parámetro de ganancia del fotodetector determinado. La intensidad de la fluorescencia calibrada de las partículas marcadas sólo necesita ser determinada una vez. Además, debido a que la intensidad de fluorescencia calibrada es independiente de la ganancia del fotodetector, la intensidad de fluorescencia calibrada puede ser medida con cualquier parámetro de ganancia adecuado del fotodetector, independiente de los parámetros usados en el ensayo final. Después de seleccionar un parámetro de la ganancia del fotodetector específico para un ensayo, el material de referencia es medido con los parámetros seleccionados para obtener el valor IFR. El valor de la intensidad de fluorescencia no calibrada de las partículas tintadas, que es específico para el parámetro de ganancia del fotodetector seleccionado, se calcula entonces a partir de la intensidad de fluorescencia calibrada determinada previamente y el valor IFR medido en las condiciones actuales.

Valores de desbordamiento calibrados independientes de la ganancia

El desbordamiento calibrado del j-ésimo colorante en un canal secundario se define en la presente memoria como la relación de la emisión calibrada de la población de partículas marcadas con colorante en el canal secundario, medida en unidades ABD, a la emisión calibrada en el canal primario, medida en unidades ABD, es decir, la relación entre la IFM de la población de partículas marcadas con colorante en el canal secundario a la IFM en el canal primario, calibrada y expresada en unidades ABD. De esta manera, el desbordamiento calibrado del j-ésimo colorante en el i-ésimo canal del detector, NS<sub>ij</sub>, es

$$NS_{ij} = \frac{ABD_{ij}}{ABD_{ji}} \quad (8)$$

en la que ABD<sub>ij</sub> es la intensidad de fluorescencia media calibrada medida desde una población de partículas marcadas con el j-ésimo colorante en el i-ésimo canal del detector (secundario), y ABD<sub>ji</sub> es la intensidad de fluorescencia media calibrada medida desde la población de partículas en el j-ésimo canal del detector (primario).

A partir de las definiciones del valor de desbordamiento calibrado y la intensidad de la fluorescencia de referencia, definidos anteriormente, el desbordamiento calibrado se define como

60

$$NS_{ij} = S_{ij} \cdot \frac{IFR_j}{IFR_i} \quad (9)$$

5 Por el contrario,

$$S_{ij} = NS_{ij} \cdot \frac{IFR_i}{IFR_j} \quad (10)$$

10 El parámetro de ganancia proporciona un factor de escala para convertir entre una fluorescencia medida expresada en unidades ABD normalizada independiente de la ganancia y expresada como una IFM dependiente de la ganancia. Los parámetros de ganancia se usan en la presente memoria para convertir entre un valor de desbordamiento dependiente de la ganancia y un valor de desbordamiento calibrado independiente de la ganancia.

15 Expresado en forma matricial, donde S es la matriz n x n de coeficientes secundarios, S<sub>ij</sub>, NS es la matriz n x n de coeficientes secundarios calibrados, NS<sub>ij</sub> y IFR es una matriz n x n que tiene un valor de intensidad de fluorescencia de referencia, IFR<sub>i</sub>, en el elemento de la i-ésima diagonal y cero en todos los elementos fuera de la diagonal,

$$NS = RFI^{-1} \cdot S \cdot RFI \quad (11)$$

30 y

$$S = RFI \cdot NS \cdot RFI^{-1} \quad (12)$$

35 Configuración del instrumento

Usando los métodos de la presente invención, la configuración del instrumento comprenderá una o más de las siguientes etapas:

- 40 1. predeterminación de los valores de desbordamiento calibrados para los reactivos de ensayo fluorescentes;
2. selección de los parámetros iniciales del instrumento, incluyendo los parámetros de ganancia del fotodetector;
- 45 3. medición de la fluorescencia de los materiales de referencia con los parámetros del instrumento seleccionado;
4. ajuste de los parámetros del instrumento seleccionado;
5. cálculo de los valores de desbordamiento no calibrados dependientes de la ganancia, y
- 50 6. cálculo de la compensación para los parámetros del instrumento seleccionado.

Las etapas 2 y 3 pueden repetirse para permitir el ajuste de los parámetros del instrumento después de las mediciones iniciales de fluorescencia del material de referencia. Cada una de etapas se describe más detalladamente, a continuación.

55 1. Valores de desbordamiento y emisión calibrados predeterminados

Los valores de desbordamiento y emisión calibrados para los reactivos de ensayo fluorescentes se obtienen, tal como se describe en la presente memoria, midiendo la IFM de un material de referencia y de una población marcada con colorante, tal como un estándar de fluorescencia, en cada canal de detección con los mismos parámetros del instrumento. Los valores calibrados se calculan tal como se ha descrito anteriormente.

60 Típicamente, los valores de rebasamiento calibrados predeterminados se determinarán una vez por cada lote de reactivos. Los valores calibrados predeterminados se determinan para un instrumento determinado. Si el instrumento se vuelve a configurar, tal como mediante el cambio de conjuntos de filtros o láseres, los valores

calibrados deberían determinarse de nuevo.

## 2. Parámetros iniciales del instrumento

5 Los parámetros iniciales del instrumento, incluyendo un conjunto inicial de parámetros de ganancia del fotodetector, se eligen preferiblemente como una aproximación de los parámetros que, probablemente, sean útiles para el ensayo contemplado. El conjunto inicial pueden ser valores por defecto almacenados en el instrumento, estimados en base a la fluorescencia esperada de los reactivos usados en el ensayo particular, o determinados experimentalmente, posiblemente usando los datos obtenidos en experimentos llevados a cabo anteriormente. Los métodos de selección de un conjunto inicial de parámetros de ganancia del fotodetector son bien conocidos en la técnica.

## 3. Fluorescencia del material de referencia

15 Usando los parámetros iniciales del instrumento, la intensidad de fluorescencia media (IFM) del material de referencia es medida en cada canal del detector. Estas mediciones son mediciones no calibradas, dependientes de la ganancia, que representan la fluorescencia observada desde el material de referencia con los parámetros de ganancia del detector seleccionado.

20 La IFM del material de referencia en cada canal de detección se usa para calcular los valores de emisión y/o desbordamiento no calibrados para cada uno de los reactivos de ensayo en base a los valores calibrados determinados previamente. Sólo es necesario medir la fluorescencia del material de referencia dependiente de la ganancia para determinar los valores no calibrados para los reactivos de ensayo en base a los valores calibrados determinados previamente.

25 En realizaciones preferidas en las que el material de referencia emite en cada canal, las emisiones de un material de referencia se miden en cada canal del detector simultáneamente. En algunas realizaciones en las que el material de referencia comprende múltiples poblaciones, en las que cada población emite en sólo un subconjunto de los canales, las mediciones de cada población pueden realizarse por separado. Usando algunos instrumentos, tales como un citómetro de flujo, las mediciones pueden realizarse usando una mezcla de las poblaciones de los materiales de referencia, y las poblaciones separadas pueden distinguirse mediante una selección de poblaciones ("gating") basada en las propiedades de fluorescencia y dispersión de las partículas de la población.

## 4. Ajuste de los parámetros iniciales del instrumento

35 El parámetro de ganancia del fotodetector puede ser ajustado si la fluorescencia esperada de una población de células tintadas con los reactivos de ensayo no estuviera "en la escala" o dentro del rango dinámico del instrumento. La IFM de una población de células tintadas con el reactivo de ensayo marcado con colorante será proporcional a la IFM medida del estándar de fluorescencia correspondiente. Esta proporcionalidad puede ser determinada empíricamente, o puede ser estimada si se conoce el número medio relativo de moléculas de colorante sobre una célula y sobre el estándar. La IFM que se mediría desde el estándar de fluorescencia con los parámetros del instrumento seleccionado puede calcularse a partir de los valores de fluorescencia calibrados predeterminados, determinados para el estándar de fluorescencia (determinados como parte de los valores de desbordamiento calibrados predeterminados) y los valores de fluorescencia de los materiales de referencia medidos con los parámetros seleccionados del instrumento. La IFM esperada de una población de células tintadas con el reactivo de ensayo marcado con colorante se estima, a continuación, a partir de la IFM calculada del estándar de fluorescencia. Si los datos esperados no estuviesen incluidos dentro de la región deseada del espacio de datos, podrían ajustarse una o más ganancias de los fotodetectores. Por ejemplo, cuando los datos se muestran en un gráfico de puntos, es deseable que los datos de las muestras negativas no estén comprimidos contra un eje. La ganancia del fotodetector puede ser aumentada para alejar los datos del eje.

50 Si se ajustan uno o más parámetros de ganancia de los fotodetectores, la fluorescencia del material de referencia debería ser medida de nuevo con los parámetros del instrumento, ajustados, actuales.

## 5. Cálculo de los valores de desbordamiento dependientes de la ganancia

55 Los valores de desbordamiento dependientes de la ganancia se calculan a partir de los valores de desbordamiento calibrados predeterminados y los parámetros de ganancia, tal como se ha descrito anteriormente. Sólo es necesario medir la fluorescencia del material de referencia dependiente de la ganancia con los parámetros iniciales específicos de la ganancia del fotodetector.

## 6. Cálculo de la compensación

60 La compensación se calcula a partir de los valores de desbordamiento dependientes de la ganancia calculados. La matriz de compensación se determina calculando los valores en la matriz de desbordamiento y, a continuación, invirtiendo la matriz de desbordamiento para obtener la matriz de compensación o, de manera equivalente, calculando directamente los valores en la matriz de compensación. Preferiblemente, la matriz de compensación se

almacena en el instrumento o el software para su uso posterior.

La matriz de compensación puede ser calculada de nuevo después de un ajuste de los parámetros de la ganancia del fotodetector en la misma manera que para los parámetros de ganancia del fotodetector originales, descritos anteriormente. Después de un ajuste de los parámetros de ganancia del fotodetector, se miden las emisiones de fluorescencia desde el material de referencia. Sólo es necesario medir las emisiones del material de referencia correspondientes a un fotodetector ajustado, aunque, típicamente será conveniente volver a medir simultáneamente las emisiones en todos los canales del fotodetector. Se calcula una matriz de desbordamiento ajustada a partir de los valores de desbordamiento calibrados predeterminados y las emisiones medidas de nuevo desde el material de referencia. Se calcula una matriz de compensación ajustada para los parámetros ajustados a partir de la matriz de desbordamiento ajustada, tal como se ha descrito anteriormente. La matriz de compensación ajustada se almacena en el instrumento o el software para su uso posterior.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se exponen a fin de proporcionar a una persona con conocimientos ordinarios en la materia una exposición y descripción completas de cómo realizar y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención.

Ejemplo 1

Preparación de estándares de fluorescencia de células T CD4<sup>+</sup>

El ejemplo describe la preparación de unos estándares de fluorescencia preferidos, útiles para medir el desbordamiento de un colorante fluorescente. Los estándares comprenden linfocitos CD4<sup>+</sup> en sangre humana fija, tintados usando anticuerpos específicos de células CD4 marcados con fluorescencia.

Anticuerpos:

Los anticuerpos específicos de CD4 preferidos incluyen los producidos a partir del clon SK3 y del clon RPA-T4, ambos disponibles en BD Biosciences (San José, CA) marcados con una diversidad de marcado de colorante. Además de las formulaciones marcadas con colorante, estos anticuerpos están disponibles también como anticuerpo purificado y marcado con biotina, cualquiera de los cuales puede ser usado para producir nuevos conjugados anticuerpo-colorante. Los ejemplos de conjugados anticuerpo-colorante disponibles en BD Biosciences para estos dos anticuerpos se muestran en la tabla, a continuación.

Ejemplos de anticuerpos específicos de células CD4, disponibles comercialmente

Marcado	Clon	Clon
Alexa Fluor® 488	RPA-T4	
Alexa Fluor® 647	RPA-T4	
Alexa Fluor® 700	RPA-T4	
AmCyan		SK3
APC	RPA-T4	SK3
APC-Cy® 7	RPA-T4	SK3
APC-H7	RPA-T4	SK3
FITC	RPA-T4	SK3
Pacific Blue®	RPA-T4	
PE	RPA-T4	SK3
PE-Cy® 5	RPA-T4	SK3
PerCP		SK3
PerCP-Cy5.5		SK3
V450	RPA-T4	
Purificado	RPA-T4	SK3
Biotina	RPA-T4	SK3

Los estándares de fluorescencia para cada colorante usado en un ensayo se crean usando los conjugados anticuerpo específico de CD4 -colorante, en los que cada conjugado anticuerpo-colorante contiene uno de los colorantes usados para marcar los reactivos de ensayo y que corresponde a uno de los canales del detector. Por ejemplo, si se usa un anticuerpo marcado con PE específico para un marcador de la superficie celular en un ensayo, un estándar de fluorescencia preferido consistiría en linfocitos CD4<sup>+</sup> en sangre humana fijada, tintados usando un anticuerpo específico de CD4, marcado con PE.



Tinción de la superficie celular:

Las muestras (50-200 µL) de sangre entera (preferiblemente recogida en EDTA) se tintaron con un conjugado anticuerpo-colorante durante 30-60 minutos en la oscuridad, a una concentración de colorante-conjugado de 1 µg o inferior por cada 0,1 ml de sangre.

Después de la tinción, se añaden 2 ml de solución 1X de Lisis FACS® (BD Bioscience, San José, CA) a la muestra, y las muestras se incuban y se lavan según el protocolo del fabricante. La solución de lisis FACS® lisa los eritrocitos y fija los linfocitos. Tras el lavado final, la muestra se vuelve a suspender en 0,5 ml de tampón de lavado (0,5% de BSA 0,1% de NaN3 en PBS) o 0,5-2% de paraformaldehído en PBS y se mantiene a 4°C hasta su uso.

Se entenderá que el conjugado anticuerpo-colorante particular usado y los componentes de reacción específicos y las condiciones de reacción particulares usadas pueden tener un efecto sobre los resultados obtenidos. Debería llevarse a cabo una experimentación rutinaria para determinar una concentración óptima de conjugado anticuerpo-colorante, componentes de reacción preferidos, tales como tampones o soluciones de lisis, y las condiciones de reacción, incluyendo los tiempos y las temperaturas de tinción, para maximizar la relación señal:ruido de las células tintadas. Dicha optimización rutinaria de las condiciones de ensayo es una práctica estándar en el campo de los ensayos basados en la inmunotinción.

Ejemplo 2

Sustitución o reemplazo de los materiales de referencia

Se espera que pueda ser necesario reemplazar un nuevo lote de producción del material de referencia, o incluso un nuevo material de referencia por el material de referencia formulado originalmente, por ejemplo, cuando el lote antiguo de material de referencia se va gastando con el tiempo. Los métodos de la presente invención permiten reemplazar un antiguo material de referencia con un nuevo material de referencia con un mínimo esfuerzo.

Las emisiones de fluorescencia del material de referencia, medidas usando los parámetros actuales del instrumento, se usan para calcular los valores de emisión no calibrada y/o de desbordamiento para los reactivos de ensayo a partir de los valores calibrados determinados previamente. Debido a que estos valores calibrados determinados previamente fueron calibrados usando la fluorescencia del antiguo material de referencia, el cálculo de los valores de emisión no calibrada y/o de desbordamiento a partir de los valores calibrados determinados previamente requiere una determinación de la fluorescencia del antiguo material de referencia. En los presentes métodos, la fluorescencia del antiguo material de referencia se obtiene a partir de la fluorescencia medida del nuevo material de referencia. Esto es posible calibrando, en primer lugar, las emisiones del nuevo material de referencia contra las emisiones del antiguo material de referencia o, de manera equivalente, midiendo la relación de las emisiones del nuevo material de referencia frente a la emisión del antiguo material de referencia. Típicamente, esta comparación del nuevo material de referencia con el antiguo material de referencia se llevará a cabo en el momento en el que el nuevo material de referencia es producido. Las intensidades de fluorescencia del nuevo material de referencia y los antiguos materiales de referencia se miden con los mismos parámetros de ganancia del fotodetector, pero estos pueden ser cualquier parámetro adecuado del fotodetector.

Usando la relación de las emisiones del nuevo material de referencia contra la emisión del antiguo material de referencia, la IFM del antiguo material de referencia en el i-ésimo canal del detector, designada  $IFM_{iref-antiguo}$ , se obtiene entonces a partir de la IFM medida del nuevo material de referencia en el i-ésimo canal del detector,  $IFM_{iref-nuevo}$ , multiplicando por la relación determinada previamente:

$$IFM_{iref-antiguo} = IFM_{iref-nuevo} \cdot \left( \frac{IFM_{iref-antiguo}}{IFM_{iref-nuevo}} \right)$$

A continuación, esta IFM calculada del antiguo material de referencia se usa para calcular los valores de emisión y/o de desbordamiento no calibrados para los reactivos de ensayo a partir de sus valores calibrados determinados previamente, tal como se ha descrito anteriormente. Los valores de desbordamiento calibrados pueden obtenerse con un parámetro similar.

De manera alternativa, los valores calibrados de fluorescencia de los reactivos, calibrados con respecto al antiguo material de referencia, pueden ser ajustados para representar valores calibrados con respecto al nuevo material de referencia. La intensidad de fluorescencia media calibrada en el i-ésimo canal del detector de una población de

perlas marcadas con el j-ésimo colorante, indicada como  $ABD_{ij}^{nuevo}$ , calibrada con respecto al nuevo material de referencia, está relacionada con la intensidad de fluorescencia media calibrada, determinada previamente, indicada como  $ABD_{ij}$ , calibrada con respecto al antiguo material de referencia, de la manera siguiente:

$$\begin{aligned}
 ABD_{ij}^{nuevo} &= C_i \cdot \frac{IFM_{ij}}{IFM_{iref-nuevo}}, \\
 &= C_i \cdot \frac{IFM_{ij}}{IFM_{iref-antiguo}} \cdot \frac{IFM_{iref-antiguo}}{IFM_{iref-nuevo}}, \\
 &= ABD_{ij} \cdot \left( \frac{IFM_{iref-antiguo}}{IFM_{iref-nuevo}} \right),
 \end{aligned}$$

en las que  $IFM_{ij}$  es la intensidad media de fluorescencia en el i-ésimo canal del detector de la población de perlas marcadas con el j-ésimo colorante,  $IFM_{iref-nuevo}$  es la intensidad media de fluorescencia en el i-ésimo canal del detector del nuevo material de referencia,  $IFM_{iref-antiguo}$ , es la intensidad de fluorescencia media en el i-ésimo canal del detector del antiguo material de referencia, y  $C_i$  es la constante del i-ésimo canal del detector asignado para su uso con el antiguo material de referencia, o, de manera equivalente,

$$= ABD_{ij} \cdot \frac{C_i}{ABD_{iref-nuevo/iref-antiguo}}$$

en la que  $ABD_{iref-nuevo/iref-antiguo}$  es la fluorescencia calibrada del nuevo material de referencia, calibrada en relación con el antiguo material de referencia.

De manera equivalente, un valor de fluorescencia calibrado, calibrado contra el nuevo material de referencia, es igual al valor de fluorescencia calibrado, calibrado contra el antiguo material de referencia, multiplicado por la relación de la intensidad de fluorescencia de referencia del antiguo material de referencia a la intensidad de referencia del nuevo material de referencia, es decir,

$$\left( \frac{IFR_{i-antiguo}}{IFR_{i-nuevo}} \right)$$

Los valores de desbordamiento calibrados pueden obtenerse con un parámetro similar.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar, en un instrumento para analizar una multiplicidad de colorantes fluorescentes usando una multiplicidad de canales de detección que tienen ganancias ajustables del fotodetector, un desbordamiento de un colorante fluorescente en un canal de detección secundario, en el que un espectro de emisión de dicho colorante está relacionado más estrechamente con un canal de detección primario, en el que el rebasamiento es específico de un conjunto final de parámetros de ganancia del fotodetector; en el que el método comprende:
- 5
- 10 a) proporcionar un material de referencia fluorescente que emite en dichos canales de detección primario y secundario;
- b) determinar un valor de desbordamiento calibrado midiendo, usando dicho instrumento ajustado a un primer conjunto de parámetros de ganancia del fotodetector, las emisiones de dicho colorante y de dicho material de referencia en dichos canales de detección primario y secundario, y calcular dicho valor de desbordamiento calibrado a partir de las emisiones medidas desde dicho colorante usando la emisión medida desde dicho material de referencia;
- 15 c) posteriormente, medir, usando dicho instrumento ajustado a dicho conjunto final de parámetros de ganancia del fotodetector en el que dicho primer conjunto de parámetros de ganancia del fotodetector y dicho conjunto final de parámetros de ganancia del fotodetector son diferentes, las emisiones de medición de dicho material de referencia en dicho canal de detección primario para obtener un primer valor de referencia y en dicho canal de detección secundario para obtener un segundo valor de referencia;
- 20 d) determinar dicho desbordamiento en dicho canal de detección secundario de dicho colorante a partir de dicho valor de desbordamiento calibrado calculado en la etapa b) y dichos valores de referencia primero y segundo medidos en la etapa c).
- 25
2. El método según la reivindicación 1, en el que dichas mediciones de las emisiones desde dicho colorante fluorescente se realizan usando un estándar de fluorescencia.
3. El método según la reivindicación 2, en el que dicho estándar de fluorescencia comprende partículas marcadas con dicho colorante fluorescente.
- 30
4. El método según la reivindicación 3, en el que dicho estándar de fluorescencia comprende partículas tintadas en duro, marcadas con dicho colorante fluorescente.
- 35
5. El método según la reivindicación 2, en el que dicho estándar de fluorescencia comprende células en una muestra de sangre, en el que dichas células son tintadas con un anticuerpo marcado con dicho colorante fluorescente.
- 40
6. Método según la reivindicación 5, en el que dichas células son linfocitos CD4<sup>+</sup> en una muestra de sangre humana fija y dicho anticuerpo se une a CD4.
7. El método según la reivindicación 1, en el que dicho material de referencia comprende micropartículas marcadas con una pluralidad de colorantes fluorescentes.
- 45
8. El método según la reivindicación 1, en el que dicho instrumento es un citómetro de flujo.
9. El método de determinación de una compensación en un instrumento para analizar una multiplicidad de colorantes fluorescentes usando una multiplicidad de canales de detección que tienen ganancias de fotodetector ajustables, en el que, para cada uno de dichos fotodetectores, uno de dichos colorantes fluorescentes es un colorante primario, en el que el método comprende:
- 50
- a) obtener los valores de desbordamiento, específicos de dicho conjunto final de parámetros de ganancia del fotodetector, en cada uno de dichos canales del detector para cada uno de dichos colorantes fluorescentes usando el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y
- 55 b) calcular la compensación para dicho conjunto final de parámetros de ganancia del fotodetector a partir de dichos valores de desbordamiento.