

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 665**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/14** (2006.01)

**G01N 35/00** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2011 E 11778379 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2566974**

54 Título: **Instrumento de diagnóstico y proceso de flujo**

30 Prioridad:

**05.05.2010 US 331787 P**

**05.05.2010 US 331782 P**

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

**28.01.2015**

73 Titular/es:

**BECKMAN COULTER BIOMEDICAL, LLC (100.0%)  
2200 Pennsylvania Avenue NW Suite 800 W  
Washington, DC 20037, US**

72 Inventor/es:

**THOMAS, RICHARD, A.;  
BROCHU, MICHAEL, W. SR.;  
BROCHU, MICHAEL, L.;  
THOMAS, ERNEST, R. y  
THOMAS, MICHAEL, A.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 527 665 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).

**DESCRIPCION**

Instrumento de diagnóstico y proceso de flujo

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un instrumento y un método de diagnóstico de análisis celular utilizando dicho instrumento que consta de una sonda acoplada a un portasondas, el cual está configurado para moverse a lo largo un riel monoaxial hasta tres posiciones distintas para sacar muestras, preparar muestras y/o reactivos y depositar la muestra y/o los reactivos respectivamente, donde dicho portasondas, dicha zona de preparación y un citómetro de flujo adicional se integran en un único instrumento.

**Antecedentes de la invención**

15 Los instrumentos de análisis celular que utilizan citómetros de flujo se conocen en este campo. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente US-11/825.523. Un citómetro de flujo dirige un flujo de partículas a través de una zona de detección donde las partículas pueden excitarse mediante un haz de luz. El haz de luz provoca la fluorescencia de las partículas y/o que dispersen la luz, y la luz emitida se separa mediante filtros en porciones del espectro electromagnético (EM). Estudiando el espectro EM filtrado, pueden realizarse análisis del contenido celular y pueden presentarse determinadas características y valores.

20 WO 2009/114514 A2 describe un sistema de preparación de muestras secuencial integrado que utiliza una centrifuga secuencial para preparar las muestras para el análisis. También se proporcionan métodos de preparación secuencial más eficiente de muestras separadas para su posterior análisis.

25 US 2010/068723 A1 describe métodos y aparatos para la interconexión de microchips a distintos tipos de módulos. La tecnología descrita puede utilizarse como sistemas de preparación y análisis de muestras para distintas aplicaciones, tales como la secuenciación y genotipificación de ADN, proteómica, detección de patógenos, diagnóstico y biodefensa.

30 El problema radica en producir un instrumento que ocupe menos espacio y que sea más fácil de nivelar, más fiable y más estable y, por último, más rápido en su desplazamiento entre unidades.

Este problema se soluciona mediante un instrumento de diagnóstico que presenta las características descritas en la reivindicación 1 o un método que presenta las características descritas en la reivindicación 7. Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

**35 Sumario de la invención**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

40 Los expertos en la materia deducirán características adicionales de la divulgación tras examinar la siguiente descripción detallada de unas realizaciones preferidas que ejemplifican la mejor forma de llevar a cabo la invención como se percibe actualmente.

**Breve descripción de los dibujos**

45 La descripción detallada se refiere en particular a las figuras adjuntas en las que:

La Fig. 1 es una vista en perspectiva de una realización de un instrumento de diagnóstico donde el instrumento se muestra acoplado a un autocargador de muestras e incluye un citómetro de flujo;

50 La Fig. 2 es una vista en perspectiva aumentada de una parte del instrumento de diagnóstico que se muestra en la Fig. 1;

La Fig. 3 es una vista en perspectiva frontal del instrumento de diagnóstico de las Figs. 1-2 que muestra el instrumento durante el funcionamiento;

55 La Fig. 4 es una vista aumentada de la parte del instrumento de diagnóstico que es capaz de tomar muestras de un único tubo de muestras a la vez;

60 La Fig. 5. es una vista en perspectiva frontal de la carcasa externa del instrumento de diagnóstico propuesto que se muestra en las Figs. 1-4;

La Fig. 6 es una vista en perspectiva frontal de la carcasa externa de otra realización en la que se ha eliminado el autocargador de muestras y se introducen los tubos de muestras a través de la puerta delantera;

65 La Fig. 7 es una representación gráfica de los datos de dos poblaciones que presentan una separación excelente según la presente invención;

La Fig. 8 es una representación gráfica de los datos de dos poblaciones que presentan una buena separación según la presente invención;

5 La Fig. 9 es una representación gráfica de los datos de dos poblaciones que presentan una separación moderada según la presente invención; y

La Fig. 10 es una representación gráfica de los datos de dos poblaciones que presentan una separación deficiente según la presente invención.

10

**Descripción detallada de los dibujos**

En las Figs. 1-6 se muestra una realización de la presente divulgación técnica de la invención en forma de un instrumento 10 de diagnóstico. En la realización ilustrada puede verse una parte autocargadora 12 con varios cartuchos 14 de muestras cargados en la misma. En esta realización, los cartuchos 14 pueden cargarse con una multitud de tubos o viales 16 de muestras idénticos (en adelante denominados “tubos”), una variedad de tubos 16 de muestras, o simplemente un único tubo 16 de muestras. Entonces los cartuchos se cargan desde arriba en la parte autocargadora 12 y se tratan en el orden recibido. Alternativamente, es decir, cuando se desea un tratamiento más rápido de una única muestra, puede introducirse un tubo de muestras directamente en un punto de entrada de muestras alternativo, esto es, la puerta 18 (visible en la Fig. 5) y tratarse antes de cualquier cartucho 14 en espera, como se muestra en la Fig. 4. Esto proporciona un acceso inmediato al análisis por parte del personal clínico, con la capacidad de realizar pruebas inmediatamente, interrumpiendo así (sin afectar negativamente) el análisis de los demás tubos de muestras cuando lo desee el personal clínico. De forma adicional, puede introducirse manualmente un tubo de muestras cuya integridad se haya visto afectada o que no tenga un código de barras (según se explica abajo).

25

Como se describe en detalle abajo, el instrumento 10 de diagnóstico lleva a cabo los siguientes pasos cuando se recibe un tubo 16 de muestras (o un cartucho 14 de tubos de muestras). Está contemplado que tales pasos los lleve a cabo el instrumento 10 sin intervención del personal clínico, y los pasos pueden modificarse, añadirse o eliminarse según el o los ensayos particulares que deban realizarse. Debe entenderse que aunque se hable de tubos de sangre a lo largo de la realización que se describe, se contempla la inclusión de otros tipos de fluidos corporales y muestras en el alcance de la descripción y es posible analizarlos en el instrumento 10 propuesto. Por ejemplo, médula ósea, suero, orina, líquido sinovial, espinal, peritoneal, pleural y otros tipos de fluidos y muestras pueden ensayarse y analizarse substancialmente como se describe a continuación:

- 35 • Mezclar (p. ej. balancear) las muestras mientras todavía están en los tubos 16 de muestras (en la realización con autocargador)
- Perforar el tapón de los tubos 16 de muestras y tomar la cantidad necesaria de muestra
- 40 • Leer los códigos de barras (o cualquier otra forma de etiquetado/identificación) para confirmar el ID de la muestra/paciente y/o para confirmar el tipo/tamaño de tubo
- Emparejar ID, ensayo(s) que deban realizarse y los reactivos necesarios, y asignar un número de serie para el seguimiento por ordenador
- 45 • Colocar la muestra en tubos o pozos vacíos seleccionados de una zona 20 de contención (que se muestra, por ejemplo, en forma de placa de microtitulación en las Figs. 1-3), para su posterior tratamiento
- 50 • Añadir los reactivos apropiados en la secuencia y el momento apropiados para preparar adecuadamente las muestras para los ensayos que se deban realizar
- Dejar que las muestras reaccionen con los reactivos durante los tiempos de incubación prescritos (variables según el reactivo)
- 55 • Separar la muestra en una multitud de tubos / pozos de la zona 20 de contención (si se desea o es necesario para el análisis)
- Seguir todas las muestras, cartuchos, reactivos y posiciones relevantes mediante códigos de barras u otro tipo de dispositivo de seguimiento (p. ej. RFID)
- 60 • Cuando sea el momento, aspirar la combinación muestra / reactivo preparada de la zona de contención y analizarla mediante el citómetro de flujo (mientras se preparan las siguientes muestras)
- 65 • Autoverificar los resultados o guardar los resultados para su revisión, según las tomas de decisiones iniciadas por el personal clínico.

El instrumento 10 está diseñado para proporcionar una toma de muestras automática e integrada, lo que significa que cada uno de los pasos anteriores (si es necesario para los ensayos específicos) pueden llevarse a cabo dentro y por el instrumento 10, sin utilizar un equipo de diagnóstico adicional. Asimismo, si lo desea el personal clínico, tales pasos pueden llevarse a cabo sin ninguna interacción por parte del personal clínico. Debe entenderse, no obstante, que el instrumento 10 puede configurarse para alertar al personal clínico en caso de error u otros problemas.

En la realización que se ilustra, el instrumento 10 utiliza un portasondas monoaxial 22 que permite realizar distintas funciones mientras el portasondas 22 se mueve a lo largo de una guía monoaxial 24. Por ejemplo, el portasondas 22 (y, por tanto, la sonda 26) puede colocarse para tomar muestras de los tubos 16 cuando el portasondas 22 está en la posición A, puede depositar las muestras en la zona 20 de contención en la posición B, y puede tomar reactivos en la posición C. Si una muestra se coloca en la bandeja pivotante 36 en cualquier momento (es decir, para el tratamiento inmediato de una muestra), el instrumento 10 notará la presencia de la muestra y la introducirá por delante de cualquiera de las muestras que esperan el tratamiento en el autocargador 12. Entonces el portasondas 22 se moverá a la posición D de forma que la sonda 26 pueda tomar muestras de los tubos colocados en la bandeja pivotante 36. Los reactivos se depositan en la zona 20 de contención antes o después de depositar la muestra (o tanto antes como después) para que reaccionen con la muestra como lo requieran el o los ensayos particulares que deban realizarse y pueden seguirse como se indica a continuación.

Los pasos pueden realizarse en el siguiente orden. Sin embargo, se contempla que determinados ensayos puedan saltarse uno o más pasos, o se pueda modificar un paso para conseguir los mejores resultados de análisis para el o los ensayos de sangre deseados.

Primero, los tubos 16 de muestras pueden cargarse en un cartucho 14 preconfigurado que sea adecuado para los tubos 16 de muestras específicos que hay que utilizar. Por ejemplo, los tubos 16 de muestras pueden ser tubos de muestras que se encuentran habitualmente de tamaño 13 mm x 75 mm, en cuyo caso puede utilizarse el cartucho 14 de cinco tubos que se muestra en las Figs. 1 y 3. Sin embargo, debe entenderse que con la presente invención pueden utilizarse una variedad de tamaños y tipos de tubos 16 de muestras y los cartuchos 14 pueden diseñarse en consecuencia. Incluso puede configurarse un cartucho 14 para que contenga una variedad de tubos 16 de muestras. Como se ha expuesto previamente, también pueden introducirse individualmente varios tamaños de tubos 16 de muestras a través de la puerta 18, que se muestra en la Fig. 5.

Si los tubos 16 de muestras tienen un tapón 32, los tubos de muestras (que contiene el cartucho 14) pueden balancearse de modo que la sangre se agite dentro del tubo y sea más homogénea (para una toma de muestras más precisa). Este balanceo ocurre en la unidad A, y el cartucho 14 puede verse en la posición de balanceo en la Fig. 3.

Durante el balanceo del cartucho 14, el portasondas 22 puede dirigirse para que se mueva hasta la unidad C y empiece la toma de muestras de las porciones apropiadas de reactivos 34 para los ensayos que se deban realizar. Sin embargo, si el ensayo no contempla que los reactivos 34 se coloquen en la zona 20 de contención antes que la muestra de sangre, entonces el portasondas 22 puede realizar ese paso tras tomar la sangre del tubo 16.

Los reactivos 34 pueden estar contenidos en viales, como puede verse en la posición C. No obstante, los reactivos pueden estar contenidos, de forma adicional o alternativa, en depósitos colocados en otro lugar, como sobre una plancha 30 de asiento (que se muestra en las Figs. 1-2) o en otras zonas (no visibles) que pueden, por ejemplo, conectarse directamente a la sonda 26.

Como se ha descrito previamente, el instrumento 10 de diagnóstico también contempla que el personal clínico pueda introducir un tubo 16 de muestras mediante una puerta exterior 18. Para adaptarse a esto, se proporciona un receptor 38 de tubos en el instrumento 10 que se ilustra, y este receptor de tubos puede alojar una variedad de tipos de tubos 16 de muestras, incluso tubos pediátricos, como puede verse en las Figs. 2-4. En el ejemplo que se ilustra, los tubos 16 de muestras están contenidos en una bandeja pivotante 36 que permite introducir y retirar fácilmente los tubos 16 de muestras. En una realización alternativa, que se muestra en la Fig. 3, los tubos 16 de muestras pueden estar contenidos en un cartucho rotatorio 40.

Entremedio y después de tomar las muestras y/o los reactivos 34, el portasondas 22 puede moverse hasta una estación 28 de lavado de sondas de forma que pueda lavarse la sonda 26. Lavar la sonda 26 evita la contaminación cruzada y, por tanto, evita resultados de ensayo erróneos.

Tras mezclar lo suficiente la muestra dentro de los tubos (es decir, en la unidad A), la sonda 26 toma una muestra y la deposita en pozos o tubos predeterminados de la zona 20 de contención. Según el o los ensayos que deban realizarse, las muestras pueden colocarse en más de un pozo o tubo y la correspondiente cantidad de muestra (como sangre) puede aspirarse con antelación. Entonces la sonda 26 se lava en la estación 28 de lavado como se ha descrito arriba.

Según si se añaden reactivos o no a las muestras después de depositarlas en la zona 20 de contención, el portasondas 22 puede moverse hasta la unidad C para tomar el o los reactivos 34 apropiados. De nuevo, si se necesita más de un reactivo, la sonda 26 se lava en la estación 28 de lavado entre la toma de cada uno de los reactivos 34 y después de tomar el reactivo 34 final.

Para depositar las muestras y los reactivos en cada pozo o tubo de la zona 20 de contención, la plancha 30 de asiento puede colocarse sobre un eje rotatorio de forma que cada pozo o tubo pueda presentarse a la sonda 26 según el punto de rotación de la plancha 30 de asiento. Este tipo de configuración y movimiento rotatorio de la plancha 30 de asiento se describe en la solicitud de patente de US-11/804.721, que se incorpora en el presente documento como referencia.

A pesar de que se contempla que un portasondas multiaxial pudiera satisfacer estos objetivos, existen determinadas ventajas para un dispositivo monoaxial. Por ejemplo, un dispositivo monoaxial requiere menos piezas y menos programación, el instrumento 10 ocupa menos espacio, es más fácil de nivelar, es más fiable y más estable y, por último, más rápido en su desplazamiento entre estaciones.

Después de colocarlas en pozos o tubos, las muestras se dejan reaccionar con los reactivos durante un tiempo específico (según los reactivos y los ensayos que deban realizarse) y luego se tratan mediante el citómetro de flujo para su análisis. Se contempla que también pueda incorporarse otro equipo de ensayo, como un equipo que utilice el volumen electrónico para determinar el tamaño y la diferenciación celulares, o medir la hemoglobina utilizando la absorbancia.

Convenientemente, la zona 20 de contención sirve de interfaz común entre la preparación de muestras y el análisis. Asimismo, la zona 20 de contención puede incluir componentes fijos o desmontables y/o desechables o reutilizables, lo cual permite al personal clínico optar por desechar toda la interfaz después de utilizarla (como en el ejemplo de una placa de microtitulación). Al servir de interfaz común entre el brazo de preparación y el brazo de análisis, la zona 20 de contención proporciona un sistema con menos exposición a los errores y a las influencias externas o ambientales.

También se incorporan en el sistema descrito un procesador y un software planificador configurado para funcionar con el procesador (no se muestra). El software planificador puede programarse, por ejemplo, para recalcular las ventanas disponibles para cinéticas de reacción fijas (optimizando el rendimiento mientras se mantienen cinéticas de reacción reproducibles) (es decir, incubaciones de anticuerpos, tiempo de lisis de eritrocitos, tiempo de extinción de reacción, etc.).

También se contempla la identificación con códigos de barras y el seguimiento de muchos artículos durante el funcionamiento. Esta identificación con códigos de barras y este seguimiento pueden registrarse mediante el software planificador. Por ejemplo, los códigos de barras pueden asignarse a viales de reactivos 34, tubos 16 de muestras (con diferentes códigos de barras para diferentes pacientes y/o tamaños), fluidos laminares, interfaces comunes (es decir, zonas 20 de contención), reactivos de preparación, reactivos en perlas, cartuchos 14, etc. Al identificar con códigos de barras estos artículos, puede seguirse una variedad de información significativa, tal como el uso/consumo de reactivos, cuántos ensayos quedan para cada una de las botellas de reactivo, caducidad de un envase abierto, caducidad de un envase cerrado, valores de análisis, etc.

El software planificador puede configurarse para realizar los siguientes pasos.

- Decidir si está bien añadir una nueva muestra en un momento determinado o no y bloquear la puerta o el multicargador (acceso aleatorio) si es prioritaria otra actividad.
- Minimizar el efecto de no disponibilidad de la puerta 18 de muestras ajustando las reacciones no cinéticas, si las hay, o las reacciones cinéticas que tienen una ventana aceptable más amplia.
- Minimizar los efectos de colisión y optimizar el rendimiento definiendo ventanas aceptables para cada reacción cinética.
- Forzar que un análisis dure un tiempo predeterminado (parada después de un tiempo/a un volumen fijo de muestra)
- Utilizar tiempos predeterminados para cada ciclo (tomar sangre, añadir reactivos, incluida la mezcla, análisis) de forma que todas las actividades puedan planificarse adecuadamente.
- Tener en cuenta todas las ventanas de tiempo de muestras planificadas para determinar si es aceptable añadir una nueva muestra a la planificación, y planificar esta nueva muestra de forma que todas sus actividades se realicen en los tiempos predeterminados.
- Tener en cuenta los recursos de hardware y las colisiones de hardware físico para determinar si se puede cumplir la planificación.

Al utilizar el instrumento 10 en combinación con el software planificador aquí descrito, el Tiempo para el Primer Resultado (TFR, por sus siglas en inglés) puede ser inferior a 15 minutos, con los resultados posteriores apareciendo aproximadamente cada 90 segundos. El rendimiento puede ser de más de 300 muestras al día, y los resultados pueden presentarse mucho más rápido y más temprano durante el día, de forma que la capacidad del laboratorio puede aumentar significativamente.

En la realización ilustrada, el análisis de los datos para obtener resultados presentables está automatizado (es decir, configuración de puertas, regiones y cursores, así como marcaje o notificación de resultados sospechosos). El aspecto de marcaje/notificación puede denominarse característica de autoverificación en el sistema.

Con toda la preparación de muestras y el análisis integrado en un instrumento 10, no es necesario que el personal clínico realice el “tratamiento por lotes” lento y tedioso en el que se recopilan las muestras y el tratamiento empieza cuando se ha recopilado un número suficiente, avanzado a través de cada paso del tratamiento de sangre con todo el grupo de muestras. Por el contrario, el instrumento 10 se configura para que prepare automáticamente las muestras de los pacientes en la zona 20 de contención, de forma que no existan tubos dependientes para etiquetar y seguir y se necesitan significativamente menos sangre y reactivos. Las muestras pueden cargarse en el sistema en cualquier momento y, en la realización ilustrada, cada una se tratará automáticamente y saldrá de las conducciones del sistema en aproximadamente 15 minutos. Las muestras posteriores podrían salir de las conducciones del sistema en intervalos de aproximadamente 90 segundos, aunque el tiempo exacto varía según los ensayos que deban realizarse y los tiempos de preparación de muestras necesarios.

Una ventaja significativa es el ahorro en costes para el laboratorio. No sólo pueden tratarse más muestras en un día, utilizando un sistema, sino que hay unos costes de sistema menores, unos costes en reactivos menores y un trabajo manual reducido. En consecuencia, el coste global de tener y hacer funcionar el instrumento 10 es significativamente menor.

Los procesos y sistemas del estado de la técnica, con sus múltiples módulos y pantallas de ordenador, ocupan entre 3,05 y 3,96 metros (10 y 13 pies) de un valioso espacio de laboratorio. Por el contrario, el instrumento 10 de diagnóstico es compacto, mide solo 78,7 centímetros (31 pulgadas) de ancho, incluida la parte autocargadora 12. La realización que se muestra en la Fig. 6 sin la parte autocargadora requiere un espacio todavía menor. También puede colocarse convenientemente un ordenador/pantalla táctil (no se muestran) sobre la parte superior del sistema, lo cual hace que el espacio ocupado sea pequeño y deja un valioso espacio libre para el laboratorio.

Se contempla que el sistema propuesto puede ser ideal para investigadores clínicos que realicen uno o más paneles de vigilancia inmunológica fijos para investigaciones por contrato, desarrollo de fármacos e investigación en centros médicos universitarios y laboratorios de referencia. Se contempla, además, que los paneles de control inmunológico estandarizados pueden controlar inmunodeficiencias (VIH-SIDA), enfermedades autoinmunitarias, respuestas al trasplante de órganos, enfermedades infecciosas, oncología y otros.

Una preocupación frecuente con los aparatos de diagnóstico que tienen citómetros de flujo es que la óptica del citómetro de flujo tiende a perder eficacia con el tiempo. Como consecuencia, lo que se necesita es un método para analizar distintos aspectos de rendimiento que puedan correlacionarse con los ensayos reales que realiza el aparato con citómetro de flujo.

En general, dos características contribuyen al rendimiento:

1. La resolución (la capacidad de medir dos partículas con la misma cantidad de fluorescencia y asignarles el mismo valor); y
2. La sensibilidad (capacidad de diferenciar entre una partícula tenue y una partícula ligeramente más brillante)

Para medir estas características, en esta industria se utilizan habitualmente “microesferas” o “perlas”. Estas microesferas están compuestas de, por ejemplo, materiales marcados con fluoróforos que tienen valores de fluorescencia conocidos. Cuando estas microesferas se pasan a través del citómetro de flujo, se han realizado determinados ensayos que reflejan los valores de resolución y sensibilidad que mide el citómetro de flujo.

Entonces, el ensayo con perlas va seguido habitualmente por otro ensayo para asegurar que los reactivos actúan adecuadamente. Los usuarios con formación en la técnica de los citómetros de flujo hacen determinaciones, basadas principalmente en experimentos o su propia percepción (variable), sobre si el citómetro de flujo estaba suficientemente “optimizado” para poder realizar los ensayos de diagnóstico que se requieren ese día.

A menudo, los ensayos de diagnóstico que deben realizarse en el citómetro de flujo tienen necesidades diferentes de resolución y sensibilidad mínimas que los ensayos con perlas y reactivos que son dominantes en la industria. A menudo se da el caso de que los ensayos con perlas y reactivos indican al personal clínico que el citómetro de flujo no está optimizado, aunque en realidad el citómetro de flujo está funcionando lo suficiente para realizar los ensayos de diagnóstico que se requieren; simplemente no ha pasado los ensayos hipotéticos con perlas y reactivos.

Por tanto, es deseable utilizar una muestra de paciente conocida, por ejemplo un control de sangre, de forma que cualquier deficiencia en la resolución o la sensibilidad pueda reducirse a los reactivos y el funcionamiento del instrumento. Cuando se utiliza una muestra de paciente conocida, por ejemplo, un control de sangre, solo los reactivos y el funcionamiento del instrumento pueden afectar los resultados de resolución y sensibilidad del ensayo.

Según otra realización de la invención, se utiliza una muestra de paciente conocida como muestra de control /muestra de ensayo inicial. La muestra de paciente conocida se caracteriza por tener poblaciones diferenciadas, p. ej. al menos dos tipos de células que sean similares o idénticas a las poblaciones que deben diagnosticarse en ese instrumento específico. En el ejemplo de un aparato de diagnóstico que realiza paneles de control inmunológico estandarizados, como el que se muestra en las Figs. 1-6, la muestra conocida tendrá un contenido celular que incluye los tipos de células (p. ej. células T CD4+) que se deben analizar en el instrumento 10.

Según esta realización de la invención, una vez que se hace pasar la muestra de paciente conocida por un instrumento 10 que se está sometiendo a evaluación, los resultados deberían indicar si el instrumento 10 ha sido capaz de detectar una multitud de poblaciones de células. Si la resolución y la sensibilidad del instrumento están optimizadas, deberían indicarse en los resultados distintas poblaciones celulares. Se puede utilizar algún software para calcular datos de dispersión de luz, volumen celular electrónico (ECV, por sus siglas en inglés) y/o fluorescencia de las formas aquí descritas.

A continuación se presenta un ejemplo de cálculos que pueden realizarse con los datos instrumentales obtenidos para determinar la efectividad de una separación de poblaciones. El valor logarítmico (“log”) de los datos obtenidos de dos poblaciones detectadas por el citómetro de flujo pueden utilizarse, más que los datos sin tratar, de forma que se elimine la variación entre el número de canal y la desviación estándar de la función. Se puede encontrar una representación gráfica de datos ilustrativos de dos poblaciones, impresa en una escala logarítmica, en la Fig. 7.

Entonces, la diferencia entre los números de canal medios (p. ej. entre dos poblaciones que observar, que se muestra en las Figs. 7-10) se divide por la diferencia entre los dos puntos de la desviación estándar de las poblaciones, de forma que se obtiene un valor de parámetro entre menos infinito y 1. Para su interpretación, este número se multiplica por 10 y se compara con una escala descrita abajo. El número resultante se denomina aquí “Valor de Exactitud de Población”.

Si las dos poblaciones son muy diferentes, es decir, al menos un 99% de la población de células están separadas entre ellas (como puede verse en la Fig. 7), en el cálculo se obtendrá un Valor de Exactitud de Población entre 3 y 10. Este tipo de Valor de Exactitud de Población puede considerarse un indicador de que las poblaciones tienen una separación “excelente”.

Si las dos poblaciones no son tan distintas, p. ej. el Valor de Exactitud de Población obtenido está entre 0 y 3, la separación puede considerarse “buena”. Esto guarda correlación con que al menos un 95% de las poblaciones están separadas entre ellas, y en la Fig. 8 puede verse un ejemplo de la representación gráfica de las poblaciones.

Cuando el Valor de Exactitud de Población obtenido es 0, este es el punto en el que las desviaciones estándar de las dos poblaciones se solapan. En este punto, aproximadamente un 5% de las poblaciones se solapan.

Cuando el Valor de Exactitud de Población obtenido está entre -3 y 0, la separación de las poblaciones puede considerarse “moderada”, puesto que se solapan más del 5% de las poblaciones. En la Fig. 9 puede verse un ejemplo de la separación de poblaciones que tienen este valor.

Finalmente, cuando el Valor de Exactitud de Población obtenido se encuentra por debajo de -3, la separación de las poblaciones puede considerarse “deficiente”, ya que la separación entre las poblaciones es menos clara y puede que los resultados no sean determinantes. En la Fig. 10 se muestra un ejemplo de la separación de poblaciones que queda en este rango.

La siguiente tabla es un ejemplo de una tabla que puede utilizar el personal clínico después de analizar la muestra de paciente conocida para determinar si el citómetro de flujo está funcionando óptimamente.

Rango numérico para Valor de Exactitud de Población	Significado
3-10	Separación excelente de forma que >99% de las poblaciones están separadas entre ellas.
0-3	Separación buena, DE>2 o aprox. un 95% de las poblaciones están separadas entre ellas.
0	Punto en que las 2 DE de las poblaciones se tocan. Aprox. un 5% de las poblaciones se solapan
-3 hasta 0	Separación moderada, ya que más del 5% de las poblaciones se solapan
<-3	Separación deficiente, peor a medida que el número va disminuyendo

Con el uso de este sistema de puntos, el personal clínico y/o los fabricantes de citómetros de flujo pueden fijar un valor estándar en el cual se sugiere el funcionamiento del citómetro de flujo. Esto ayudará a eliminar llamadas innecesarias al servicio técnico originadas cuando los citómetros de flujo no pasan un ensayo con perlas hipotético. Asimismo, el sistema de puntos descrito permitirá al personal clínico determinar cuándo un aparato de citómetro de flujo puede realizar determinados ensayos, pero tal vez no está suficientemente optimizado para realizar otros ensayos.

El ensayo de optimización mejorado que se describe aquí se propone para asegurar la calidad del instrumento y el citómetro de flujo. El método propuesto analiza la separación de poblaciones para medir el rendimiento del instrumento. Este tipo de método también puede utilizar la separación de poblaciones para medir muestras y/o realizar cálculos de calidad utilizando un software similar a los de dispersión, ECV y/o fluorescencia.

5 La realización descrita también puede utilizarse para obtener una estadística para medir la resolución y la sensibilidad de un instrumento 10 para un parámetro específico en un ensayo determinado y cuantificarlo en términos de suficiencia para realizar el ensayo. Entonces, este tipo de estadística puede utilizarse para determinar si los materiales utilizados en el ensayo son adecuados. Por ejemplo, la estadística puede utilizarse para definir las necesidades mínimas de resolución y sensibilidad del paquete reactivos/citómetro y luego analizar si el paquete reactivos/citómetro está funcionando adecuadamente para realizar el ensayo en cualquier paciente. La estadística también puede utilizarse para determinar si los datos de una muestra de paciente previa deberían aceptarse como exactos. El resultado final también puede constituir un medio numérico de cualificación del rendimiento para un ensayo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un instrumento de diagnóstico de análisis celular para preparar y analizar muestras, comprendiendo el instrumento de diagnóstico:
- 5 un portasondas (22) configurado para desplazarse a lo largo de una guía monoaxial (24),  
una sonda (26) acoplada al portasondas (22) para aspirar y depositar muestras y reactivos,
- 10 una multitud de cartuchos (14) de tubos, estando cada cartucho (14) de tubos configurado para contener en su interior una multitud de tubos (16) que contienen muestras,  
una zona (20) de contención que tiene tubos o pozos vacíos para el tratamiento de las muestras, y
- 15 un citómetro de flujo acoplado a la zona (20) de contención para analizar las muestras tratadas,  
en el que el portasondas (22) está configurado para:
- 20 a. colocar la sonda (26) para tomar muestras de los tubos (16) de un cartucho (14) de tubos cuando el portasondas (22) se desplaza a una posición A a lo largo de la guía monoaxial (24);  
b. colocar la sonda (26) para aspirar reactivos cuando el portasondas (22) se desplaza a una posición C a lo largo de la guía monoaxial (24); y
- 25 c. colocar la sonda (26) para depositar las muestras que se han tomado y/o los reactivos aspirados en el tubo o pozo de la zona (20) de contención cuando el portasondas (22) se desplaza a una posición B a lo largo de la guía monoaxial (24).
2. El instrumento de diagnóstico de la reivindicación 1 que además comprende una bandeja pivotante (36) configurada para alojar una variedad de tipos de tubos (16) que contienen muestras.
3. El instrumento de diagnóstico de la reivindicación 2 que además comprende una puerta exterior (18) para introducir los tubos (16) que contienen muestras en la bandeja pivotante (36).
- 35 4. El instrumento de diagnóstico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que además comprende una estación (28) de lavado de sondas para lavar la sonda.
5. El instrumento de diagnóstico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que además comprende un procesador y un software planificador configurado para funcionar con el procesador, en donde el software planificador está programado para recalcular ventanas disponibles para cinéticas de reacción fijas.
- 40 6. El instrumento de diagnóstico de la reivindicación 5, en el que el software planificador está además programado para seguir el consumo de reactivos utilizando un código de barras.
- 45 7. Un método para preparar y analizar una muestra en un tubo, comprendiendo el método los pasos de:  
cargar un cartucho de tubos en una parte autocargadora de un instrumento de diagnóstico de análisis celular, estando configurado el cartucho de tubos para contener una multitud de tubos,  
50 desplazar una sonda acoplada a un portasondas a lo largo de un eje hasta una posición A para tomar muestra de un tubo seleccionado de los tubos,  
desplazar la sonda a lo largo del eje único hasta una posición B para depositar la muestra en un pozo o tubo de una zona de contención del instrumento de diagnóstico,  
55 desplazar la sonda a lo largo del eje único hasta una posición C para tomar una cantidad adecuada de un reactivo para el citómetro de flujo,  
depositar el reactivo en el pozo o tubo de la zona de contención para preparar la muestra para un ensayo, y  
60 analizar la combinación muestra/reactivo preparada con un citómetro de flujo,  
en el que la sonda, la zona de contención y el citómetro de flujo están integrados en un único instrumento.
- 65 8. El método de la reivindicación 7 que además comprende el paso de empezar la toma de muestras de un tubo nuevo y repetir el proceso mientras la primera muestra está reaccionando con el reactivo.

9. El método de la reivindicación 7 u 8 que además comprende el paso de introducir un tubo a través de un punto de entrada distinto, estando designado este tubo para la toma de muestras y el diagnóstico entre los cartuchos de tubos pendientes que se encuentran contenidos en el cargador de cartuchos de tubos.
- 5 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 que además comprende el balanceo del cartucho de tubos en la unidad A de forma que se homogeneicen los fluidos del interior de la multitud de tubos.
11. El método de la reivindicación 10 en el que la sonda se desplaza hasta la posición C durante el balanceo del cartucho de tubos.
- 10 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 que además comprende la perforación del tapón del tubo que contiene la muestra y tomar una cantidad necesaria de muestra en la sonda.
- 15 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 que además comprende configurar un temporizador para cronometrar la reacción de la muestra y el reactivo.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 en el que el único instrumento realiza cada paso del método.
- 20 15. El método de la reivindicación 14 en el que el único instrumento realiza cada paso del método sin la intervención del personal clínico.

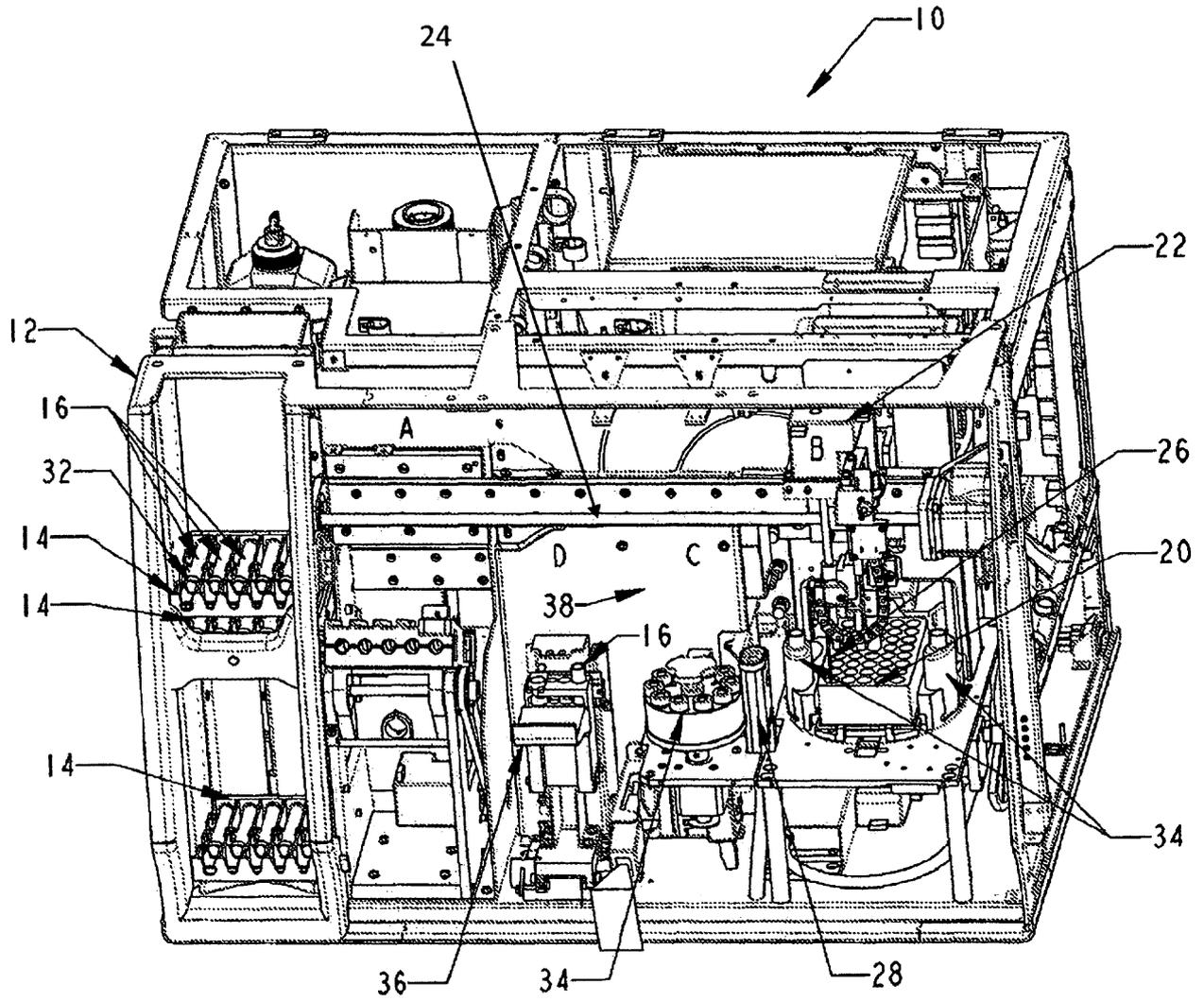


Fig. 1

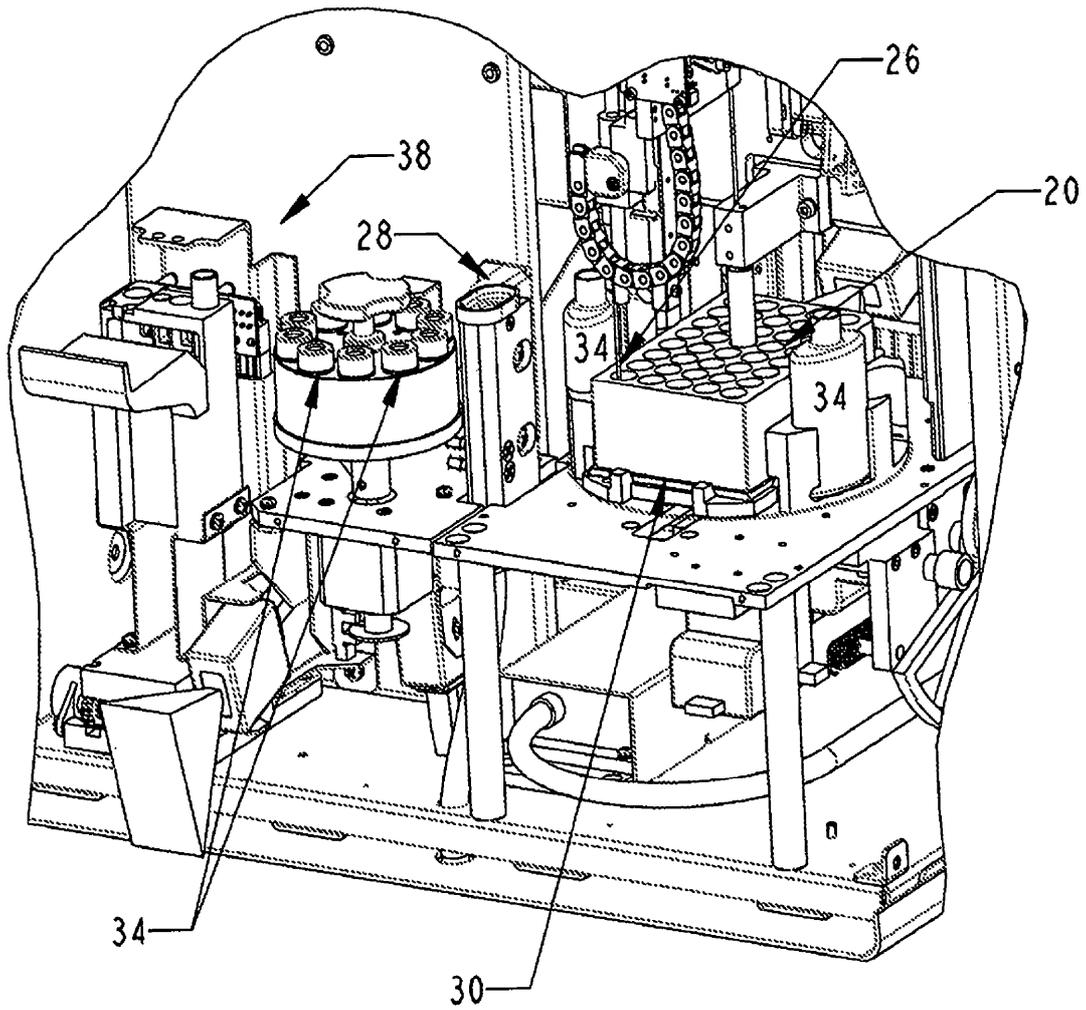


Fig. 2

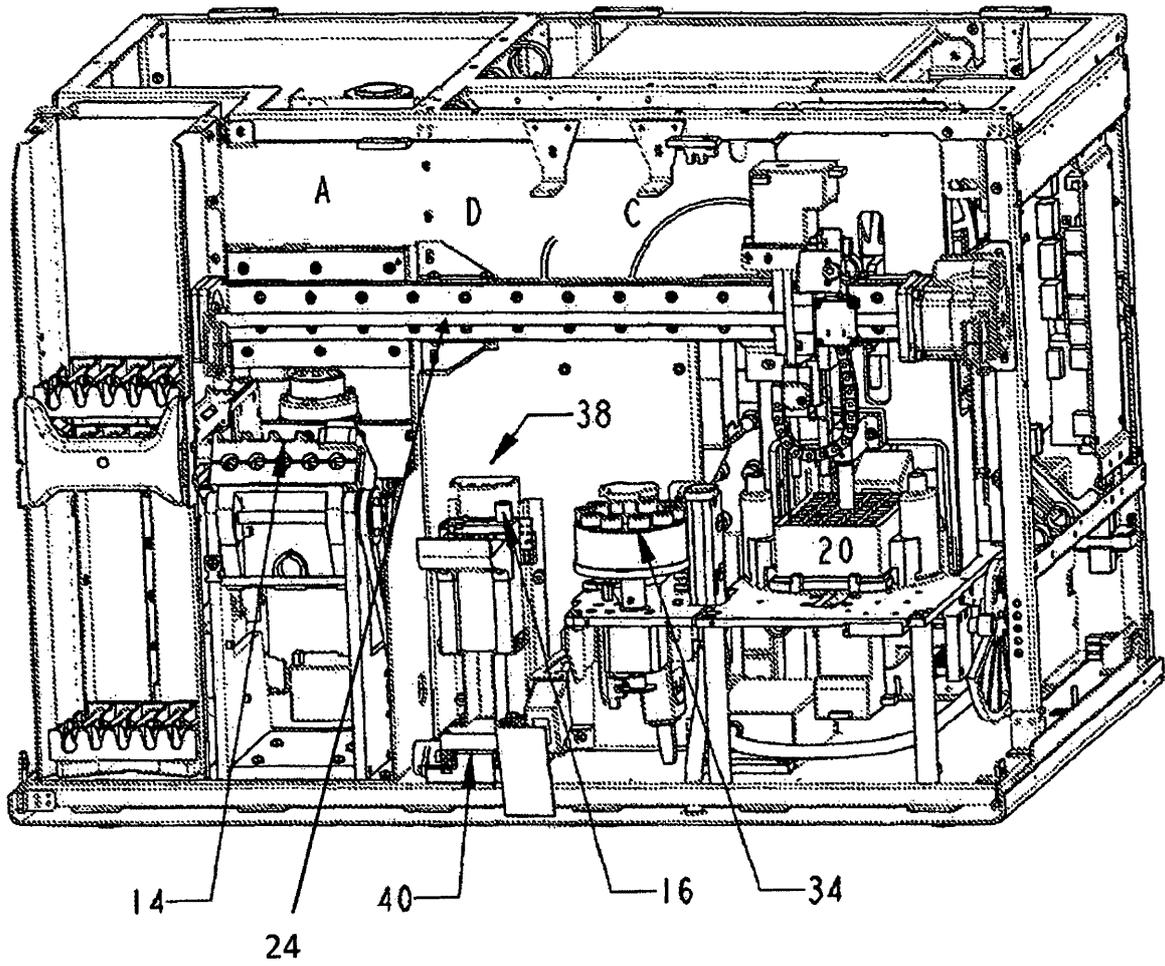


Fig. 3

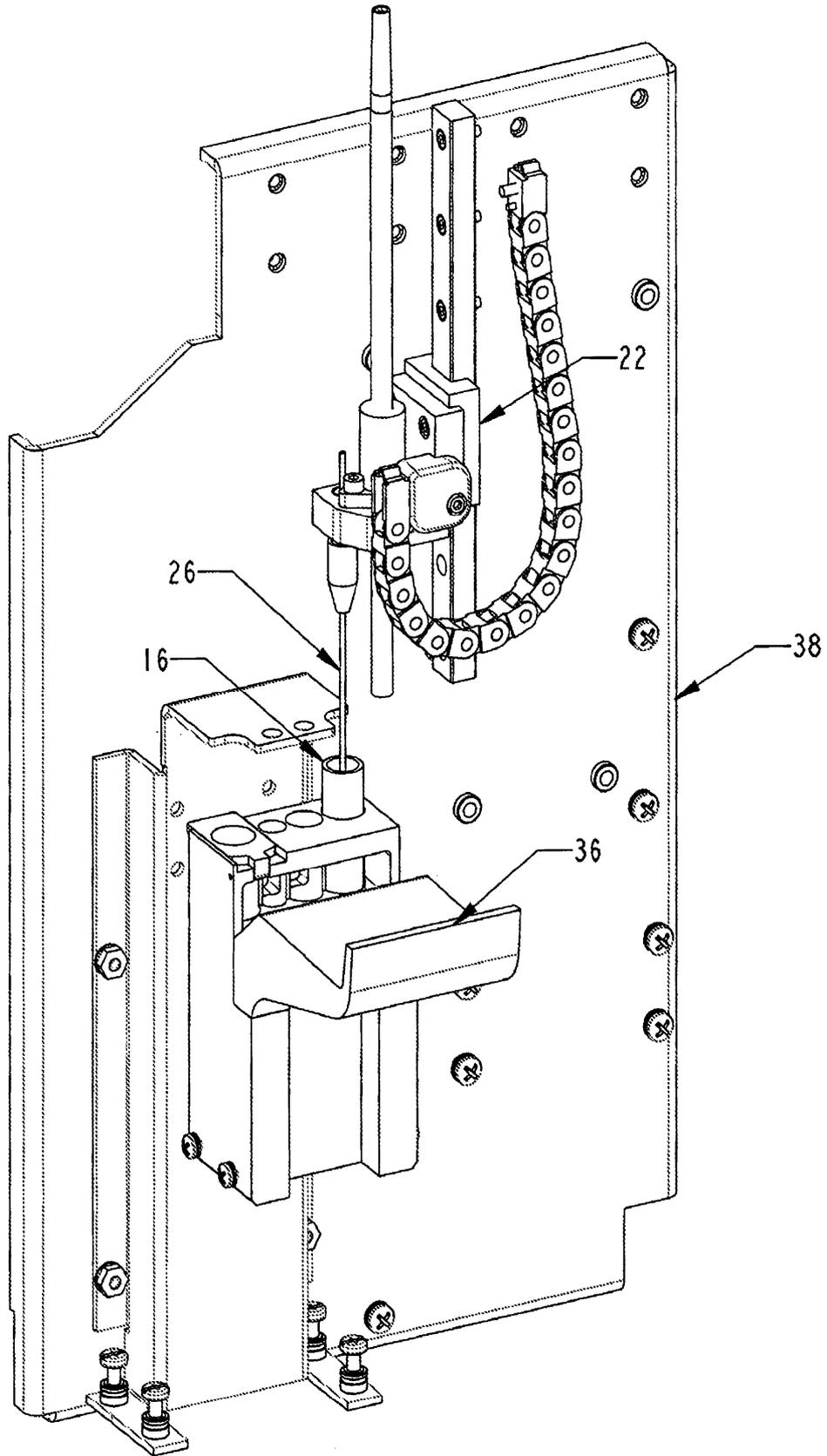


Fig. 4

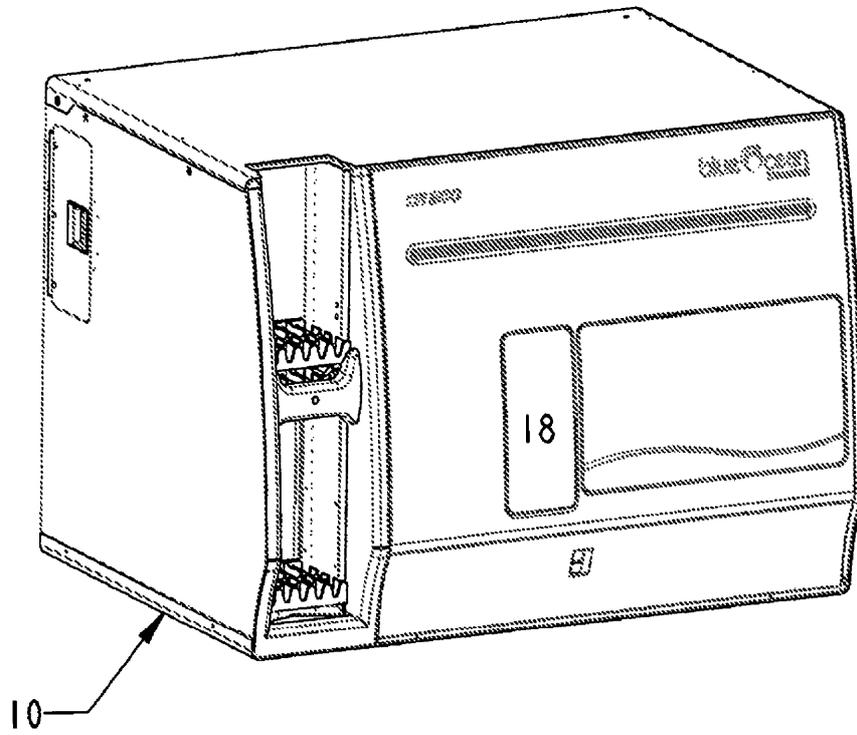


Fig. 5

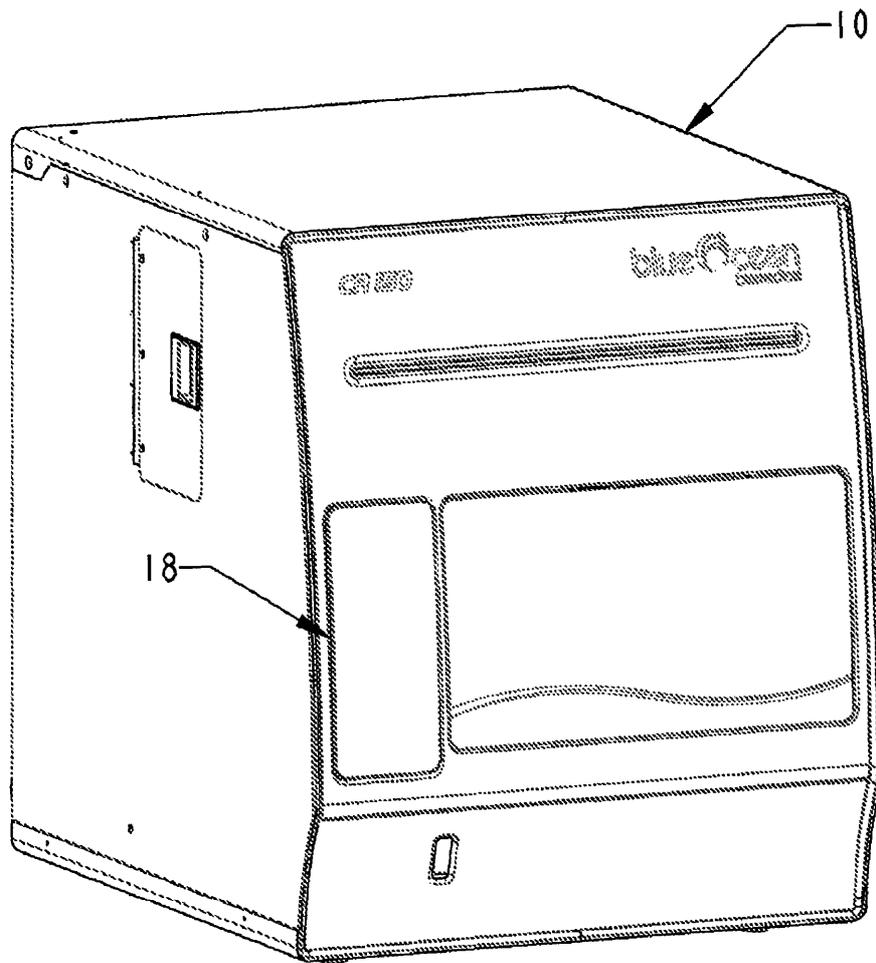


Fig. 6