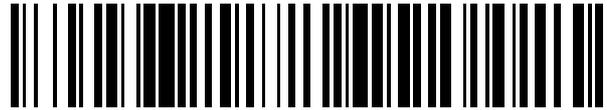


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 320**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2002 E 02736972 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 1395374**

54 Título: **Citómetro de flujo con un sistema de alienación óptica automatizado activo**

30 Prioridad:

17.05.2001 US 291736 P

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

30.05.2013

73 Titular/es:

**BECKMAN COULTER, INC. (100.0%)
250 S. KRAEMER BOULEVARD
BREA, CA 92821 , US**

72 Inventor/es:

SHARPE, JOHNATHAN C.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 405 320 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

Citómetro de flujo con un sistema de alineación óptica automatizado activo

5 **I. Campo técnico**

Un sistema automatizado de monitorización y alineación para posicionar los componentes mecánicos y ópticos de un citómetro de flujo para mejorar la consistencia, rendimiento, y eficacia de la clasificación de partículas y de las aplicaciones de análisis.

10

II. Antecedentes

La citometría de flujo proporciona un método para analizar y diferenciar partículas que se aplica a diversas aplicaciones clínicas y de investigación. Generalmente, los sistemas de citómetro de flujo irradian partículas y a continuación detectan la radiación emitida por la partícula para identificar un atributo o atributos físicos particulares de la partícula o partículas individuales que se están estudiando. En las aplicaciones de clasificación de partículas, cada partícula se puede separar de la población principal en base a los atributos físicos identificados como se divulga, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos con números 5.643.796; 5.602.349; y 5.602.039; y en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US95/13308.

15

20

Durante la operación de los citómetros de flujo, un enfoque hidrodinámico arrastra partículas en una corriente de fluido de modo que se pueden introducir individualmente en un área objetivo o área de análisis. Se puede inducir que la corriente de fluido forme gotitas para posteriormente ayudar en la separación de partículas individuales. Típicamente, los citómetros de flujo usan una fuente de emisión de radiación electromagnética tal como un láser para generar un rayo de radiación electromagnética que se puede controlar direccionalmente para interceptar el área objetivo. La radiación de una partícula objetivo que pasa a través del área objetivo, tal como una célula, puede dar lugar a una emisión de dispersión o fluorescencia que se puede controlar direccionalmente a un receptor que genera una señal que se puede analizar para diferenciar las partículas.

25

30

Un problema importante con los sistemas de citómetro de flujo convencionales puede ser que el análisis preciso de tal emisión de difusión o fluorescencia requiere que el área objetivo permanezca alineada de forma precisa con el rayo de radiación electromagnética y que la emisión de dispersión o fluorescencia de la irradiación del objetivo permanezca alineada de forma precisa con el detector. Sin embargo, la posición de los diversos componentes de un citómetro de flujo cambia en respuesta a pequeñas fluctuaciones en el ambiente externo, que incluyen, pero no se limitan a, pequeñas fluctuaciones en la temperatura, presión, y fuerzas mecánicas, así como pequeñas fluctuaciones en el entorno interno, que incluyen, pero no se limitan a, deriva electrónica, frecuencia o amplitud de la radiación, o similares. Las fluctuaciones pueden ocurrir durante la preparación del instrumento o durante la operación de rutina del instrumento provocando una diversidad de problemas.

35

40

En primer lugar, el periodo de tiempo que un operador dedica a alinear un citómetro de flujo al comienzo de un período operación o durante la operación de rutina del citómetro de flujo puede ser considerable. Esto puede significar una parte importante del tiempo programado del operador en el instrumento y puede abreviar o incluso impedir cualquier esfuerzo real de análisis.

45

En segundo lugar, la monitorización de la alineación durante largos períodos de tiempo, tal vez horas, puede ser difícil a simple vista. Incluso las más pequeñas variaciones en la alineación pueden traducirse en señales inútiles en el detector o dar como resultado un aumento de la contaminación de las poblaciones de partículas clasificadas. La corrección de la alineación sobre la marcha por parte del operador del citómetro de flujo puede no ser fiable dado que los datos disponibles por el operador pueden dar como resultado estimaciones subjetivas de la verdadera alineación.

50

En tercer lugar, la inconsistencia de alineación a alineación puede impedir satisfactoriamente la calibración de los citómetros de flujo con respecto a partículas de calibración estandarizadas. Con frecuencia se usan parámetros del instrumento distintos de la alineación para calibrar el instrumento una vez que el operador optimiza subjetivamente la alineación óptica. Los que estén familiarizados con la citometría de flujo pueden ser conscientes de que una calibración del instrumento realizada de esta manera puede conducir a una amplia y a veces inaceptable variación en los resultados de operación, incluso durante las aplicaciones de rutina.

55

En cuarto lugar, debido a que los sistemas de citómetro de flujo convencionales no tienen el equipamiento de monitorización de la alineación necesario para determinar si un sistema de citometría de flujo está alineado, está ligeramente fuera de alineación y requiere de un ajuste, o si el sistema está catastróficamente desalineado, puede ser difícil permitir que un sistema de citómetro de flujo convencional opere sin ser atendido por un operador.

60

Se han hecho diversos intentos para montar físicamente todos los componentes ópticos en sistemas convencionales de citómetro de flujo para que aborden estas preocupaciones. Desafortunadamente, tales sistemas de citómetro de flujo todavía pueden ser propensos a la deriva mecánica y de temperatura y necesitan regularmente un servicio de

65

mantenimiento para la recalibración de la alineación. Además, los componentes ópticos montados físicamente pueden estar disponibles solo con respecto a ciertos sistemas de citómetro de flujo basados en cubeta.

5 En lo que se refiere al campo de la citometría de flujo y al deseo general de automatizar y monitorizar la alineación mecánica y óptica de los sistemas de citometría de flujo, la presente invención divulga técnicas que superan virtualmente cada uno de estos problemas de un modo práctico.

10 Tal vez de manera sorprendente, esto satisface la necesidad percibida desde hace tiempo de conseguir métodos de alta velocidad, precisión y económicos para el posicionamiento automatizado de los componentes dentro del citómetro de flujo. Hasta cierto punto, incluso los que están implicados en la fabricación de citómetros de flujo no apreciarían que los problemas de monitorización y control direccional para la alineación de un sistema de citómetro de flujo se podrían solucionar utilizando los diversos componentes que se divulgan en la presente invención.

15 La patente de Estados Unidos US4318481 describe un aparato automático para cargar sincronizadamente gotitas en un sistema de clasificación de flujo electrostático. La posición en la que se perturba el flujo laminar de modo que forme las gotitas se monitoriza usando una fuente de luz y un detector. La patente de Estados Unidos US4498766 divulga un aparato de citometría de flujo que tiene una lente de enfoque de un rayo que se rota de modo que produzca una mancha elíptica del rayo alargando de esa manera la mancha focal del rayo. En el documento WO98/34094, se divulgan diversas disposiciones de prisma para controlar la geometría del rayo.

20

III. Divulgación de la invención

25 La presente invención incluye una diversidad de aspectos que se pueden seleccionar en diferentes combinaciones en base a la aplicación o a las necesidades particulares a las que se dirige. En una realización básica, la presente invención divulga un sistema de control de alineación y monitorización que usa detección posicional, direccional, o de imagen para controlar la alineación de diversos componentes de un citómetro de flujo.

30 Un objetivo general adicional de las realizaciones particulares de la presente invención puede ser permitir la monitorización de la alineación durante la operación de rutina de un citómetro de flujo. En consonancia con este objetivo, una meta puede ser proporcionar una imagen óptica de la región objetivo del citómetro de flujo para permitir una determinación muy precisa de esta posición, y de la de las fuentes de radiación electromagnética, tales como láseres.

35 Otro objetivo de las realizaciones particulares de la presente invención puede ser permitir la alineación durante la operación normal de citometría de flujo, que incluye pero no se limita al procesamiento de partículas. En consonancia con este objetivo, una meta es utilizar un esquema de control que se pueda emplear sin interferir con el procesamiento del citómetro de flujo para proporcionar un nivel muy preciso de la precisión de alineación.

40 Un objetivo adicional de las realizaciones particulares de la presente invención puede ser permitir la monitorización sin afectar la calidad de las medidas realizadas por el sistema de citómetro de flujo. Este objetivo tiene la meta de proporcionar un sistema de monitorización no intrusivo que use detectores sensibles a la posición, o fuentes de iluminación para fines de formación de imagen que se localizan de modo que no interfieran físicamente, o espectralmente, con la ruta óptica del citómetro de flujo.

45 Aún otro objetivo de las realizaciones particulares de la presente invención puede ser proporcionar un diseño que minimice los requisitos de espacio de las proximidades de la región de detección. En consonancia con este objetivo, una meta es utilizar tantos dispositivos ya empleados en la citometría de flujo (lentes, dispositivos de detección de imagen, etc.) como para minimizar la intrusión y las complicaciones operacionales.

50 Naturalmente, se divulgan objetivos adicionales de la presente invención en otras áreas de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones.

55 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se divulga un sistema de alineación óptica de un citómetro de flujo, como se describe en la reivindicación 1.

Preferentemente dicho detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética muestrea una parte de dicho rayo de radiación electromagnética en una posición entre dicho al menos un elemento óptico y dicho objetivo.

60 Preferentemente dicho detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética muestrea una parte de dicho rayo de radiación electromagnética después de la incidencia de dicho rayo de radiación electromagnética sobre dicho objetivo.

Preferentemente dicho detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética comprende un detector de

65 fotodiodo de cuadrante.

Preferentemente el sistema de alineación óptica del citómetro de flujo comprende adicionalmente una corriente de fluido, donde dicho objetivo comprende una posición en dicha corriente de fluido, y donde dicho rayo de radiación electromagnética se alinea con dicha posición en dicha corriente de fluido.

- 5 Preferentemente el sistema de alineación óptica del citómetro de flujo comprende adicionalmente partículas arrastradas en dicha corriente de fluido, donde dicho rayo de radiación electromagnética alineado con dicha posición en dicha corriente de fluido irradia al menos a una de dichas partículas arrastradas en dicha corriente de fluido.

- 10 Preferentemente el sistema de alineación óptica del citómetro de flujo comprende adicionalmente una boquilla que tiene una abertura de boquilla, donde dicha corriente de fluido sale a través de dicha abertura de boquilla.

Preferentemente el sistema de alineación óptica del citómetro de flujo comprende adicionalmente:

- 15 a. un elemento óptico adicional al que dicho rayo de radiación electromagnética emitido desde dicha fuente de emisión de radiación electromagnética responde direccionalmente;
- b. un detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética que tiene una superficie posicionada para recibir una parte de dicha rayo de radiación electromagnética, donde la incidencia de dicha parte de dicho rayo de radiación electromagnética sobre dicha superficie genera una señal de corrección de la dirección del rayo de radiación electromagnética; y
- 20 c. un dispositivo de control de posición adicional acoplado a dicho elemento óptico adicional, donde dicho dispositivo de control de posición adicional responde a dicha señal de corrección de la dirección del rayo de radiación electromagnética para alinear automáticamente dicho rayo de radiación electromagnética sobre dicho objetivo.

- 25 Preferentemente dicho detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética muestrea una parte de dicho rayo de radiación electromagnética en una posición entre dicho al menos un elemento óptico y dicho objetivo.

- 30 Preferentemente dicho detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética muestrea una parte de dicho rayo de radiación electromagnética después de la incidencia de dicho rayo de radiación electromagnética sobre dicho objetivo.

Preferentemente el sistema de alineación óptica del citómetro de flujo comprende adicionalmente:

- 35 a. un elemento de polarización de radiación electromagnética;
- b. un rayo de radiación electromagnética emitido desde dicho objetivo coaxial a dicha ruta de excitación que responde a dicho elemento de polarización de radiación electromagnética;
- 40 c. un elemento reflectante sensible a la polarización que refleja dicho rayo de radiación electromagnética emitido desde dicho objetivo polarizado por dicho elemento de polarización de radiación electromagnética; y
- d. un dispositivo de captura de representación de imagen que responde a dicha radiación electromagnética emitida desde dicho objetivo polarizada por dicho elemento de polarización de radiación electromagnética.

- 45 Preferentemente el sistema de alineación óptica del citómetro de flujo comprende adicionalmente:

- a. un elemento de iluminación posicionado para proporcionar la iluminación de dicha corriente de fluido;
- 50 b. una pantalla de imagen incidente a la emisión de radiación electromagnética generada por dicha partícula y dicha iluminación de dicha corriente de fluido;
- c. una imagen generada en dicha pantalla de imagen de dicha emisión de radiación electromagnética generada por dicha partícula y dicha iluminación de dicha corriente de fluido;
- 55 d. al menos una abertura de la pantalla de imagen a través de la cual pasa al menos parte de dicha emisión de radiación electromagnética generada por dicha partícula;
- e. un receptor incidente a dicha al menos parte de dicha emisión de radiación electromagnética generada por dicha partícula; y
- 60 f. un dispositivo de captura de representación de imagen que responde a dicha imagen generada sobre dicha pantalla de imagen, donde dicho dispositivo de captura de representación de imagen genera una señal de posición del rayo de radiación electromagnética.

- 65 Preferentemente el sistema de alineación óptica del citómetro de flujo comprende adicionalmente:

a. al menos un elemento de almacenamiento de memoria que responde a dicha señal de posición del rayo electromagnético;

5 b. un elemento de recuperación para recuperar dicha señal de posición del rayo electromagnético de dicho al menos un elemento de almacenamiento de memoria;

c. un elemento de análisis de la señal de posición del rayo electromagnético; y

10 d. un controlador que proporciona una señal de corrección de la posición del rayo de radiación electromagnética para posicionar los dispositivos de control acoplados a dicho al menos un elemento óptico.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un citómetro de flujo, que comprende:

15 a. una boquilla que tiene una abertura de boquilla;

b. una corriente de fluido que sale de dicha boquilla a través de dicha abertura de boquilla;

c. un generador de gotitas al que dicha corriente de fluido responde formando gotitas, donde dichas gotitas tienen un punto de desprendimiento a una distancia de dicha abertura de boquilla;

20 d. un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención;

donde el rayo de radiación electromagnética sigue una ruta a través de dicha corriente de fluido entre dicha abertura de boquilla y su punto de desprendimiento y donde el objetivo está localizado donde el rayo pasa a través de la corriente de fluido.

25 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un método para el control de dirección de un rayo de radiación electromagnética de un citómetro de flujo, que comprende las etapas de:

a. emitir un rayo de radiación electromagnética que responde direccionalmente a un elemento óptico;

b. muestrear una parte de dicho rayo de radiación electromagnética en una superficie posicionalmente sensible a la incidencia de dicho rayo de radiación electromagnética;

30 c. generar una señal de posición del rayo de radiación electromagnética que corresponde a la posición de dicha incidencia de dicho rayo de radiación electromagnética sobre dicha superficie;

d. analizar dicha señal de posición del rayo de radiación electromagnética;

e. determinar el error de alineación de dicho rayo de radiación electromagnética sobre un objetivo;

35 f. generar una señal de corrección de la dirección del rayo de radiación electromagnética; y

g. ajustar dicho elemento óptico para corregir el error de alineación de dicho rayo electromagnético con una posición objetivo.

40 Preferentemente el método para el control de dirección de un rayo de radiación electromagnética de un citómetro de flujo comprende adicionalmente la etapa de hacer correr un fluido a través de dicha posición objetivo.

Preferentemente el método para el control de dirección de un rayo de radiación electromagnética de un citómetro de flujo comprende adicionalmente la etapa de arrastrar al menos una partícula en dicho fluido, donde dicho rayo de radiación electromagnética irradia dicha partícula en dicha posición objetivo.

45 **IV. Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 ilustra una realización particular de la presente invención que usa detección posicional, direccional, o de imagen para controlar la alineación de diversos componentes de un citómetro de flujo.

50 La Figura 2 proporciona una vista ampliada de una realización particular de la presente invención que tiene una corriente de fluido que sale de la punta de una boquilla.

55 La Figura 3 proporciona una vista aumentada de una realización particular de una pantalla de imagen que tiene aberturas de pantalla sobre la que incide una representación de imagen de una corriente de fluido y un patrón de emisión de radiación.

La Figura 4 proporciona un diagrama de bloques funcional de una realización particular de un sistema de control de alineación con respecto a la presente invención.

60 La Figura 5 proporciona un diagrama de flujo de un algoritmo de alineación de acuerdo con la presente invención.

V. Modo o modos de llevar a cabo la invención

65 La presente invención proporciona un sistema de alineación y monitorización que se puede usar con respecto a diversas aplicaciones. Mientras que la descripción proporciona ejemplos detallados en el contexto de la aplicación

del citómetro de flujo de gotitas o de chorro continuo, tales ejemplos no pretenden limitar el uso de la presente invención a aplicaciones en citometría de flujo sino que se debería entender que son ilustrativas de la amplia variedad de aplicaciones en las que se puede usar la presente invención.

5 A continuación por referencia principalmente a las Figuras 1 y 2, se puede entender que las realizaciones particulares de la presente invención pueden proporcionar un sistema de alineación y monitorización que se puede poner en práctica junto con citómetro o citómetros de flujo de gotitas o de chorro continuo. En una realización de un citómetro de flujo (1) de la presente invención, una fuente de corriente de fluido (2) proporciona una corriente de fluido (3) en la que se pueden suspender partículas (4). Una fuente de partículas (5) puede insertar las partículas
10 cada cierto tiempo de modo que al menos una partícula quede arrastrada o se enfoque hidrodinámicamente en la corriente de fluido (3). Un oscilador (6) que responde a la corriente de fluido (3) perturba la corriente de fluido. Se puede establecer a continuación una corriente de fluido (7) que arrastra las partículas (4) por debajo de la punta de la boquilla (8) del citómetro de flujo. La corriente se puede establecer en una condición de estado estacionario de modo que se formen gotitas (9) que encapsulan una partícula individual (4) y se desprenden de la parte contigua de la corriente. Cuando se establece la corriente de fluido (7) en esta forma de estado estacionario, se puede establecer
15 un punto de desprendimiento de la gotita (10) estable. Por debajo del punto de desprendimiento de la gotita (10) puede existir una zona de caída libre (11). Esta zona de caída libre (11) incluye el área donde las gotitas se mueven una vez que se han desprendido de la parte contigua de la corriente. Una fuente de radiación electromagnética (12), tal como un láser, que emite un rayo de radiación electromagnética (13) y un receptor (14) en combinación (o separadamente), se pueden usar para monitorizar la corriente de fluido (7) para una partícula (4). El receptor (14) genera una señal (42) en respuesta a la emisión fluorescente o de dispersión incidente desde la intercepción de la partícula (4) con el rayo de radiación electromagnética (13).

Por ejemplo, un rayo de radiación electromagnética (13), tal como un rayo láser, emitido desde una fuente de radiación electromagnética (12), tal como un láser, se puede dirigir a la corriente de fluido (7) para interceptar un objetivo (22), tal como una partícula (4) en la corriente de fluido (7). Tras la irradiación del objetivo (22), se puede generar una emisión (15) de fluorescencia o dispersión. La emisión (15) de fluorescencia o dispersión se puede hacer incidir en el receptor (14), tal como un tubo fotomultiplicador, para generar una señal de emisión (42) que se puede analizar. De manera importante, se debería observar que pueden existir una pluralidad de rutas de rayos de radiación electromagnética y de rutas de emisión de fluorescencia o dispersión dentro de un sistema de citometría de flujo individual, cada una de las cuales se pueden monitorizar y controlar direccionalmente por la presente invención.

En base al análisis de la señal de emisión (42) generada por el receptor (14) que corresponde a la aparición de fluorescencia o a la aparición de luz dispersada, se puede diferenciar la partícula o partículas (4). Puede existir una posición de cargado (16) de la gotita en un punto a lo largo de la zona de caída libre (11). En base al tipo de partícula (4), la gotita (9) se puede cargar positivamente, negativamente, o permanecer sin carga. Dado que las gotitas cargadas (17) caen en la zona de caída libre, pueden pasar a través de un campo electrostático (18). Si las gotitas se han cargado con una carga positiva o negativa, el campo electrostático (18) establecido entre las placas electrostáticas (19) puede desviar las gotitas cargadas de modo que la trayectoria de las gotitas desviadas y la trayectoria de las gotitas neutras sirven para separar un tipo de partícula de las otras. Estas partículas separadas se pueden recoger a continuación en un contenedor o contenedores (20).

A continuación por referencia principalmente a la Figura 1, la presente invención puede comprender adicionalmente uno o más elementos focales (21) para maximizar la intensidad de la radiación sobre el objetivo (22) que puede ser una posición en la corriente de fluido (7). El elemento focal (21) puede responder a un elemento de control de posición (23) que puede permitir que el elemento focal (21) viaje (a menudo alrededor del eje óptico de la dirección de luz de excitación) y mantenga enfocado el rayo de radiación electromagnética (13) o el rayo láser sobre el objetivo (22).

En ciertas realizaciones de la presente invención el rayo de radiación electromagnética (13) emitido desde la fuente de emisión de radiación electromagnética (12) puede responder direccionalmente al menos a un elemento óptico (24) para dirigir o conducir el rayo de radiación electromagnética (13) hacia el área objetivo (22). El elemento óptico (24) puede comprender uno o más elementos reflectantes, tales como espejos. Estos elementos ópticos (24) se pueden montar de forma ajustable para proporcionar una posición o un ángulo variables, y por lo tanto poder controlar la dirección del rayo de radiación electromagnética (13).

De nuevo por referencia principalmente a la Figura 1, se puede colocar un elemento parcialmente reflectante (26) individual, o una pluralidad de elementos parcialmente reflectantes, tales como divisores de haz, en la ruta del rayo de radiación electromagnética (13) antes de la incidencia sobre el objetivo (22) para muestrear una parte del rayo de radiación electromagnética (27) en al menos un dispositivo direccionalmente sensible (28). El dispositivo o dispositivos direccionalmente sensibles (27) pueden ser por ejemplo un detector de fotodiodo de cuadrante que genera una fotocorriente en cada cuadrante. Comparando la fotocorriente generada en cada cuadrante, se puede detectar el cambio direccional en dos ejes (25) y se puede generar una señal de posición del rayo de radiación electromagnética (30), como se divulga, por ejemplo, en Silicon Sensors, http://www.siliconsensors.com/bpd_a.htm (2000); y en Hamatsu, Two-Dimensional PSDs, S5990, S5991, o S4744, (1997).

En otras realizaciones de la presente invención, se puede localizar un dispositivo direccionalmente sensible (43) de modo que el rayo de radiación electromagnética incida en primer lugar sobre el objetivo (22) y a continuación incida sobre la superficie del dispositivo direccionalmente sensible (43). Naturalmente, en ciertas realizaciones de la presente invención se pueden localizar dispositivos direccionalmente sensibles (28) antes que la incidencia del rayo de radiación electromagnética (13) sobre el objetivo (22) y se pueden localizar dispositivos direccionalmente sensibles (43) después de la incidencia del rayo de radiación electromagnética (13) sobre el objetivo (22). De nuevo, por comparación de la fotocorriente generada por las diversas áreas fotosensibles de la superficie del dispositivo o dispositivos direccionalmente sensibles (28)(43), se puede detectar un cambio direccional en dos ejes (25) y se puede generar una señal de posición del rayo electromagnético (30)(44).

La señal de posición del rayo electromagnético (30)(44) se analiza mediante un sistema de control (45), como se discute adicionalmente posteriormente, y se transmite una señal de corrección de posición (46) a al menos un dispositivo de control de posición (23) acoplado al elemento o elementos ópticos ajustables (24) o al elemento focal (21). La posición del dispositivo o dispositivos de control de posición puede proporcionar ejes independientes de control del movimiento que permiten una corrección de posición nanométrica del elemento o elementos ópticos ajustables con una precisión de aproximadamente 30 nanómetros. Por ejemplo, se puede usar como dispositivo de control de posición (23) una montura central motorizada y un controlador multieje con una etapa de traslación XYZ como se fabrica por New Focus, Inc. 2630 Walsh Avenue, Santa Clara, CA (por ejemplo los números de catálogo 8882 y 8732). Véase también, Nano-Motion System Performs Closed Loop Control of Picomotors, Automation View, Vol. 6, No. 2, 10 (2001). Ajustando la posición del elemento o elementos ópticos ajustables (24), el rayo de radiación electromagnética se puede controlar direccionalmente para mantener la alineación con una posición objetivo existente o para establecer la alineación con una nueva posición objetivo.

A continuación por referencia principalmente a las Figuras 1 y 3, ciertas realizaciones de la presente invención pueden comprender adicionalmente un dispositivo de captura de representación de imagen (31) tal como una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD) que se puede usar para capturar una representación de una imagen (32) de la corriente de fluido (7) establecida por debajo de la punta de la boquilla (8) y cualquier emisión de fluorescencia o dispersión (15) generada por el objetivo (22), tal como una partícula (4), dentro de la corriente de fluido (7) en una pantalla de imagen (33).

Una fuente de iluminación (47) puede dirigir emisiones electromagnéticas dentro de una banda de longitud de onda conocida hacia el área objetivo del citómetro de flujo (22). El fin de esta iluminación puede ser proyectar una imagen de la corriente de fluido (7) del área objetivo (22) en la pantalla de imagen (33) en el plano de imagen de un elemento focal (21). La banda de longitud de onda de esta fuente de iluminación (47) se puede eliminar significativamente, de modo que no interfiera, de cualquiera de las bandas de longitud de onda de interés para los fines del análisis del objetivo (22) o de la partícula (4). Esta fuente de iluminación (47) puede permanecer habilitada simultáneamente con la irradiación de un objetivo (22) o de una partícula (4) en la corriente de fluido (7).

La pantalla de imagen (33) puede comprender adicionalmente una sola o una pluralidad de aberturas de la pantalla de imagen (34) en las que se puede alinear el rayo de emisión de fluorescencia o dispersión (15) desde el objetivo (22). La dirección de desplazamiento del rayo de emisión de fluorescencia o dispersión se puede evaluar determinando la porción de área de la abertura (35) a través de la cual el rayo de emisión de fluorescencia o dispersión (15) no pasa a su través.

Se pueden dirigir una pluralidad de rayos de radiación electromagnética sobre la corriente de fluido (7) para interrogar a una partícula individual (4) arrastrada dentro de la corriente de fluido (7) una pluralidad de veces. Como tal, se pueden colocar uno solo o una pluralidad de elementos de filtrado de una longitud de onda selectiva (28) entre la imagen (32) y el dispositivo de formación de imagen (31) para proporcionar una selección de la longitud de onda de la imagen formada de la emisión de dispersión o fluorescencia (15).

Se puede almacenar una señal de la imagen (36) en el elemento de almacenamiento de memoria (30) y a continuación recuperarse, y analizarse usando software u otros algoritmos para calibrar, monitorizar, cambiar, y modificar las condiciones reales en el objetivo (22) a través de un control de retroalimentación como se divulga en el documento WO 99/44037.

Para permitir un posicionamiento preciso del rayo de radiación electromagnética (13) en el área objetivo (22), la boquilla del citómetro de flujo (48) se puede montar de forma ajustable de manera que responda al menos a un dispositivo de control de posición (49) tal como etapas accionadas de traslación rotatoria o lineal. Los dispositivos de control de posición (23)(49) pueden recibir a continuación una señal de corrección de posición (46) para restituir o mantener la corriente de fluido en la posición correcta para alinear el objetivo (22) con el rayo de radiación electromagnética o para alinear la emisión de dispersión o fluorescencia (15) con las aberturas de la pantalla de imagen y el receptor (14).

De nuevo por referencia principalmente a la Figura 1, en ciertas realizaciones de la presente invención se puede utilizar un dispositivo de captura de representación de imagen (27) tal como una cámara CCD para visualizar las partículas del área objetivo (tal vez coaxialmente con la ruta del rayo de radiación electromagnética (13) a través del

elemento focal (21) usado para concentrar el rayo de radiación electromagnética (13) sobre el objetivo (22) que se van a analizar. La posición del elemento focal (21) se puede controlar mediante un dispositivo o dispositivos de control de posición (23) de modo que la posición y la dirección tanto de la ruta de la emisión de radiación que forma la imagen (39) como de la ruta del rayo de radiación electromagnética (13) se puedan controlar direccionalmente y simultáneamente.

La formación de imagen se puede conseguir mediante el uso de un elemento de polarización de radiación (40) tal como un retardador/hoja de retardo de fase para alterar el estado de la polarización de la ruta del rayo de radiación electromagnética (13), y de un elemento reflectante sensible a la polarización (41). El elemento reflectante sensible a la polarización (41) se puede usar para reflejar una parte variable del rayo de radiación electromagnética (13) a un dispositivo sensible a la posición (50), siendo dependiente esta proporción de la posición o de la orientación del elemento de polarización de radiación (40).

A continuación por referencia principalmente a las Figuras 4 y 5, un dispositivo de control o sistema de control (45) puede responder a cada señal direccional (30)(44)(51) generada por cada dispositivo direccionalmente sensible (28)(43)(50) y responder a cada señal de imagen (36)(52) generada por cada dispositivo de formación de imagen (31)(37) que se puede almacenar en al menos un elemento de almacenamiento de memoria (30) y se puede recuperar y analizar periódicamente mediante el sistema de control (45). Un controlador (53) proporciona las señales de corrección de posición (46) a los dispositivos de control de posición (46)(49)(23). Véase también, por ejemplo, el documento WO 01/28700 A1.

A continuación por referencia principalmente a la Figura 5, se muestra una realización de un diagrama de flujo para un algoritmo de alineación donde se lleva a cabo una secuencia de etapas mediante un ordenador u otro dispositivo electrónico (54) para monitorizar y controlar un sistema de alineación de citómetro de flujo. La primera etapa puede ser la calibración y el almacenamiento de los parámetros de operación iniciales (56) antes de que se habilite el algoritmo de control de retroalimentación como podrían esperar los que le resulta familiar la técnica. Una etapa de habilitación (57) inicia el algoritmo de control (58) para aceptar y analizar las señales de posición (59) para determinar el error de alineación y para transmitir las señales de corrección de posición (60) a los diversos dispositivos de control de posición (23)(49) para controlar posicionalmente la alineación de las diversas rutas de rayos de radiación (13)(15) como se ha discutido anteriormente. El sistema de control de alineación puede deshabilitar (62) el citómetro de flujo, si no se puede conseguir la alineación de las diversas rutas de rayos de radiación (13)(15).

Como se puede comprender fácilmente a partir de lo expuesto anteriormente, los conceptos básicos de la presente invención se pueden realizar de una diversidad de maneras. Esto implica diversas realizaciones de sistemas de alineación y monitorización. En la presente solicitud de patente, los métodos y las técnicas usados con los sistemas de alineación y monitorización se divulgan como parte de los resultados mostrados que se han conseguido mediante los diversos dispositivos que se han descrito y como etapas que son inherentes a su uso. Estos son simplemente el resultado natural del uso de dispositivos según lo que se ha previsto y descrito. Además, mientras que se divulgan algunos dispositivos, se debería entender que estos no solo logran ciertos métodos sino que también se pueden variar en un número de formas. De forma importante, en cuanto a todo lo expuesto anteriormente, se debería entender que todas estas facetas se incluirán en la presente divulgación.

Se pretende que la discusión incluida en la presente solicitud de patente internacional de Tratado de Cooperación en Materia de Patentes sirva como una descripción básica. El lector debería ser consciente de que la discusión específica no puede describir explícitamente todas las realizaciones posibles; numerosas alternativas están implícitas. Tampoco puede explicar completamente la naturaleza genérica de la presente invención y puede no mostrar explícitamente como cada característica o elemento puede ser realmente representativo de una función más amplia o de una gran variedad de elementos alternativos o equivalentes. De nuevo, estos están incluidos implícitamente en la presente divulgación. Cuando la presente invención se describe en terminología orientada de manera funcional, cada aspecto de la función se puede lograr mediante un dispositivo, subrutina o programa. Las reivindicaciones del aparato pueden estar no solo incluidas para los dispositivos que se han descrito, sino que también pueden estar incluidas reivindicaciones de métodos o procesos para abordar las funciones que la invención y cada elemento llevan a cabo. No se pretende que ni la descripción ni la terminología limiten el ámbito de las reivindicaciones.

Además, cada uno de los diversos elementos de la presente invención y de las reivindicaciones también se puede lograr de una diversidad de maneras. Se debería entender que la presente divulgación incluye cada variación, sea una variación de una realización de cualquier realización del aparato, una realización de método o de procedimiento, o incluso meramente una variación de cualquier elemento de estos. Particularmente, se debería entender que dado que la divulgación se refiere a elementos de la presente invención, las palabras para cada elemento se pueden expresar mediante términos de aparato o términos de método equivalentes -- incluso si solamente la función o el resultado es el mismo. Se debería considerar que tales términos equivalentes, más amplios, o incluso más genéricos se incluyen en la descripción de cada elemento o acción. Tales términos se pueden sustituir cuando se desee para hacer explícita la cobertura implícitamente amplia a la que la presente invención da derecho. A modo de ejemplo, se debería entender que todas las acciones se pueden expresar como medios para seguir esa acción o como un

elemento que causa esa acción. De forma similar, se debería entender que cada elemento físico divulgado incluye una divulgación de la acción que ese elemento físico facilita. Con respecto a este último aspecto, a modo de ejemplo, se debería entender que la divulgación de una "imagen" incluye la divulgación del acto de "formar la imagen" -- tanto si se ha discutido explícitamente como si no -- y, a la inversa, cuando solo se divulga el acto de "formar la imagen", se debería entender que tal divulgación incluye la divulgación de una "imagen" e incluso los "medios para formar la imagen". Se entiende que tales cambios y términos alternativos se incluyen explícitamente en la descripción. Además, se pueden crear y presentar las diversas combinaciones y permutaciones de todos los elementos o aplicaciones. Todo ello se puede hacer para optimizar el diseño o el rendimiento en una aplicación específica.

5

10

La Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/291.736, presentada el 17 de mayo de 2001, así como los siguientes documentos, también son pertinentes para la materia objeto de la presente solicitud.

I. DOCUMENTOS DE PATENTE DE ESTADOS UNIDOS

Documento N°	Fecha	Nombre	Clase	Subclase	Fecha de presentación
3.299.354	17/12/67	Hogg	207	582	05/07/62
3.661.460	09/05/72	Elking et al.	356	36	28/08/70
3.710.933	16/01/73	Fulwyler et al	209	3	23/12/71
3.761.941	25/09/73	Robertson	346	1	13/10/72
3.810.010	07/05/74	Thom	324	71	27/11/72
3.826.364	30/06/74	Bonner, et al	209	3	22/05/72
3.833.796	03/11/74	Fetner et al	235	151.3	13/10/71
3.960.449	01/07/76	Carleton et al	356	103	05/06/75
3.963.606	15/06/76	Hogg	209	3	03/06/74
3.973.196	03/08/76	Hogg	324	71	05/06/75
4.014.611	29/03/77	Simpson et al	356	72	30/04/75
4.070.617	24/01/78	Kachel et al	324	71	03/08/76
4.162.282	24/07/79	Fulwyler et al	264	9	22/04/76
4.230.558	28/10/80	Fulwyler	209	3.1	02/10/78
4.302.166	24/11/81	Fulwyler et al	425	6	15/03/79
4.317.520	02/03/82	Lombardo et al	209	3.1	20/08/79
4.318.480	09/03/82	Lombardo et al	209	3.1	20/08/79
4.318.481	09/03/82	Lombardo et al	209	3.1	20/08/79
4.318.482	09/03/82	Barry et al	209	3.1	20/08/79
4.318.483	09/03/82	Lombardo et al	209	3.1	20/08/79
4.325.483	20/04/82	Lombardo et al	209	3.1	20/08/79
4.341.471	27/07/82	Hogg et al	356	343	02/01/79
4.350.410	21/09/82	Minott	350	170	08/10/80
4.361.400	30/11/82	Gray et al	356	23	26/11/80
4.395.676	26/07/83	Hollinger et al	324	71.4	24/11/80
4.400.764	23/08/83	Kenyon	362	263	19/05/81
4.487.320	11/12/84	Auer	209	3.1	03/11/80
4.498.766	12/02/85	Unterleitner	356	73	25/03/82
4.515.274	07/05/85	Hollinger et al	209	3.1	02/12/81
4.523.809	18/06/85	Toboada et al	350	163	04/08/83

ES 2 405 320 T3

Documento N°	Fecha	Nombre	Clase	Subclase	Fecha de presentación
4.538.733	03/11/85	Hoffman	209	3.1	14/10/83
4.598.408	01/07/86	O'Keefe	372	94	22/10/84
4.600.302	15/07/86	Sage, Jr.	356	39	26/03/84
4.631.483	23/12/86	Proni et al	324	71.4	01/02/84
4.673.288	16/06/87	Thomas et al	356	72	07/11/84
4.691.829	08/09/87	Auer	209	3.1	06/12/84
4.702.598	27/10/87	Böhmer	356	343	25/02/85
4.744.090	10/05/88	Freiberg	372	94	08/07/85
4.758.729	19/07/88	Monnin	250	560	28/08/87
4.794.086	27/01/88	Kasper et al	436	36	25/11/85
4.818.103	04/04/89	Thomas et al	356	72	20/01/87
4.831.385	16/05/89	Archer et al	346	1.1	14/10/87
4.845.025	04/07/89	Lary et al	435	2	10/11/87
4.942.305	17/07/90	Sommer	250	574	12/05/89
4.981.580	01/01/91	Auer	209	3.1	01/05/89
4.983.038	08/01/91	Ohki et al	356	246	07/04/88
5.005.981	09/04/91	Schulte et al	366	219	08/09/89
5.007.732	16/04/91	Ohki et al	356	73	18/04/88
5.030.002	09/07/91	North, Jr.	356	73	11/08/89
5.079.959	14/01/92	Miyake et al	73	864.85	08/09/89
5.098.657	24/03/92	Blackford et al	422	73	07/08/89
5.101.978	07/04/92	Marcus	209	3.1	27/11/89
5.127.729	07/07/92	Oetliker et al	356	317	15/10/86
5.144.224	01/09/92	Larsen	324	71.4	01/04/91
5.150.313	22/09/92	Van den Engh et al	364	569	12/04/90
5.159.397	27/10/92	Kosaka et al	356	73	05/09/91
5.159.403	27/10/92	Kosaka	356	243	19/03/91
5.167.926	01/12/92	Kimura et al	422	67	11/09/90
5.180.065	19/01/93	Touge et al	209	577	11/10/90
5.182.617	26/01/93	Yoneyama et al	356	440	29/06/90
5.199.576	06/04/93	Corio et al	209	564	05/04/91
5.215.376	01/06/93	Schulte et al	366	348	09/03/92
5.247.339	21/09/93	Ogino	356	73	05/09/91
5.259.593	09/11/93	Orme et al	266	78	16/04/92
5.260.764	09/11/93	Fukuda et al	356	73	29/05/90
5.298.967	29/03/94	Wells	356	336	02/06/92
5.359.907	01/11/94	Baker et al	73	865.5	12/11/92
5.370.842	06/12/94	Miyazaki et al	422	82.06	20/11/92
5.412.466	02/05/95	Ogino	356	246	22/05/92

ES 2 405 320 T3

Documento N°	Fecha	Nombre	Clase	Subclase	Fecha de presentación
5.452.054	19/09/95	Dewa et al	355	67	21/11/94
5.466.572	14/11/95	Sasaki, et al	435	2	25/04/94
5.467.189	14/11/95	Kreikebaum et al	356	336	12/01/95
5.483.469	09/01/96	Van den Engh et al	364	555	02/08/93
5.558.998	24/09/96	Hammond, et al	435	6	05/06/95
5.596.401	21/01/97	Kusuzawa	356	23	14/09/94
5.601.235	11/02/97	Booker et al	239	4	15/11/94
5.602.039	11-02-97	Van den Engh	436	164	14-10-94
5602349	11/02/97	Van den Engh	73	864.85	14/10/94
5.641.457	24/07/97	Vardanega, et al	422	82.01	25/04/95
5.643.796	01/07/97	Van den Engh et al	436	50	14/10/4
5.650.847	22/07/97	Maltsev et al	356	336	14/06/95
5.675.401	07/10/97	Wangler et al	355	67	15/06/95
5.700.692	23/12/97	Sweet	436	50	27/09/94
5.707.808	13/01/98	Roslaniec et al	435	6	15/04/96

II. Documentos de Patente Extranjeros

Documento N°	Fecha	País	Clase	Subclase	Traducción	
					Sí	No
DE19549015	04-03-97	Alemania	21	85		
EP025296A2	18/03/81	Europa	G01N15	07		
EP0468100A1	29/01/92	Europa	G01N15	14		
EP0160201A2	06/11/85	Europa	G01N15	14		
EP 0781 985 A2	25/11/96	Europea				
FR2699678-A1	23/12/92	Francia	G01N21	64		
JP4126064 (A)	27/04/92	Japón	A23P1	08		
JP4126065 (A)	27/04/92	Japón	A23P1	12		
JP4126066 (A)	27/04/92	Japón	C12M1	02		
JP4126079 (A)	27/04/92	Japón	C12N9	48		
JP4126080 (A)	27/04/92	Japón	C12N9	90		
JP4126081 (A)	27/04/92	Japón	C12N15	02		
JP61139747 (A)	27/06/86	Japón	G01N21	53		
JP2024535	26/01/90	Japón	G01N015	14		
JP61159135 (A)	18/07/86	Japón	G01N21	17		
SU1056008	23/11/83	Unión Soviética	G01N021	24		
SU1260778-A1	30/09/86	Rusia	G01N21	64		

III. Otros Documentos que incluyen Autor, Título, Fecha, Páginas Pertinentes, Etc.)

"Axicon; Journal of the Optical Society of America", Vol. 44, #8, Eastman Kodak Company, Hawk-Eye Works, Rochester, NY, 10/09/53, pp. 592-597
Garner, D.L., et al; "Quantification of the X- and Y- Chromosome-Bearing Spermatozoa of Domestic Animals by Flow Cytometry", Biology of Reproduction 28, pag. 312-321, (1983)
Hamamatsu Photonics, "One-Dimensional PSD's S4580, S4581, S4852, S4583, S4584, S5629, S7105", 4 páginas, 1999
Hamamatsu Photonics, "Position-Sensitive Detectors (PSD) S3270", 4 páginas, 1997
Hamamatsu Photonics, "Two Dimensional PSD's S5990, S5991", 2 páginas, 1997
Hamamatsu Photonics, "Long Active Area PSD S5730", 1994, 2 páginas
Hamamatsu Photonics, "One Dimensional PSD's S3979, S3931, S3932 Series", 4 páginas, 1997
Hamamatsu Technical Data, "2-Dimensional PSD S4744". 2 páginas, 1994
Herzenberg, L., et al., "Fluorescence-activated Cell Sorting", Scientific American, 234(3), pp 108-117.
Horan, P. and Wheelless, Jr., L., "Quantitative Single Cell Analysis and Sorting", Science, 198, pp 149-157, octubre de 1977.
Johnson, L.A., "Sex Preselection by Flow Cytometric Separation of X and Y Chromosome-bearing Sperm based on DNA Difference: a Review", Reprod. Fertil. Dev., 1995, 7, pag. 893-903
Melamed et al, "An Historical Review of the Development of Flow Cytometers and Sorters", 1979, pp. 3-9
Pinkel et al , "Flow Chambers and Sample Handling," by., 1985, pp. 77-128
Radbruch (Ed.), "Operation of a Flow Cytometer" by Gottlinger et al., 1992, pp. 7-23
Shapiro, H., "Practical Flow Cytometry", Alan R. Liss, Inc., 1985.
Silicon Sensors, "Beam Position Detector: BPD Selection Guide", http://www.siliconsensors.com/bpd_s.htm , 2 páginas, impreso el 13 de marzo de 2000
Silicon Sensors, "Beam Position Detector: BPD schematic", http://www.siliconsensors.com/bpd_d.htm , 1 página, impreso el 13 de marzo de 2000
Silicon Sensors, "Beam Position Detector: BPD Selection, Guide to Applying the BPD Dimensions & Schematic Pricing", http://www.siliconsensors.com/bpd.htm , 2 páginas, impreso el 13 de marzo de 2000
Silicon Sensors, "Beam Position Detector: Part Numbers", http://www.siliconsensors.com/bpd_p.htm , 2 páginas, impreso el 13 de marzo de 2000
Silicon Sensors, "Beam Position Detector: Using the BPD for Position Sensing", http://www.siliconsensors.com/bpd_a.htm , 3 páginas, impreso el 13 de marzo de 2000
Skogen-Hagenson, M.J., et al; "A High Efficiency Flow Cytometer," The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 25, No. 7, pp. 784-789, 1977, USA
Van Dilla et al. (Eds.), , "Overview of Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis" Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis, 1985, pp. 1-8

Además, en lo que se refiere a cada término usado se debería entender que a menos que su utilización en la presente solicitud fuera inconsistente con tal interpretación, se debería entender que las definiciones del diccionario común se incorporan para cada término y todas las definiciones, términos alternativos, y sinónimos tales como los contenidos en el diccionario Random House Webster's Unabridged Dictionary, segunda edición, se incorporan por la presente como referencia. Sin embargo, en lo que se refiere a cada uno de los anteriores, en el caso de que tal información o exposición incorporada por referencia se pudiera considerar inconsistente con la patente de la presente invención o las presentes invenciones tales exposiciones no se considerarán expresamente como realizadas por el solicitante o solicitantes.

Además, a menos que el contexto requiera otra cosa, se debería entender que el término "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se pretende que implique la inclusión del elemento o etapa o grupo de elementos o etapas expresados pero no la exclusión de cualquier otro elemento o etapa o grupo de elementos o etapas.

Por lo tanto, se debería entender que el solicitante o solicitantes tienen apoyo para reivindicar al menos: i) cada uno de los sistemas de alineación óptica de citómetro de flujo como se divulgan y se describen en el presente documento, ii) los métodos relacionados que se divulgan y se describen, iii) variaciones similares, equivalentes, e incluso implícitas de cada uno de estos dispositivos y métodos, iv) los diseños alternativos que logran cada una de las funciones mostradas como se divulgan y se describen, v) los diseños y métodos alternativos que logran cada una de las funciones mostradas que están implícitos para lograr lo que se divulga y se describe, vi) cada característica, componente, y etapa mostrada como invenciones separadas e independientes, vii) las aplicaciones mejoradas mediante los diversos sistemas o componentes que se divulgan, viii) los productos resultantes que se producen mediante tales sistemas o componentes, ix) métodos y aparatos básicamente como se han descrito anteriormente en el presente documento y con referencia a cualquiera de los ejemplos acompañantes, y x) las diversas combinaciones y permutaciones de cada uno de los elementos que se divulgan.

Las reivindicaciones que se exponen en la presente memoria descriptiva se incorporan por la presente como referencia como parte de la presente descripción de la presente invención, y el solicitante se reserva expresamente el derecho a usar todo o una parte de tal contenido incorporado de tales reivindicaciones como uso adicional de todo o de parte de tal contenido incorporado de tales reivindicaciones como descripción adicional para respaldar cualquiera o todas las reivindicaciones o cualquier elemento o componente de las mismas, y adicionalmente el solicitante se reserva expresamente el derecho a mover cualquier parte o todo el contenido incorporado de tales reivindicaciones o cualquier elemento o componente de las mismas desde la descripción a las reivindicaciones o viceversa según sea necesario para definir la materia objeto para cuya protección se solicita mediante la presente solicitud o mediante cualquier solicitud posterior de continuación, división, o continuación en parte de la misma, o para obtener cualquier beneficio de, reducción de tasas conforme a, o para cumplir con las leyes, reglas, o normas de patentes de cualquier país o tratado, y tal contenido que se incorpora por referencia perdure durante la completa tramitación de la presente solicitud incluyendo cualquier solicitud posterior de continuación, división, o continuación en parte de la misma o cualquier reexpedición o extensión sobre la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo, que comprende:
 - 5 a. un objetivo (22);
 - b. una fuente de emisión de radiación electromagnética (12) para la emisión de un rayo de radiación electromagnética;
 - c. al menos un elemento óptico (24) para el control de la dirección del rayo de radiación electromagnética;
 - 10 d. un detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética (28, 43) que tiene una superficie localizada para recibir una parte de dicho rayo de radiación electromagnética, donde la incidencia de dicha parte de dicho rayo de radiación electromagnética sobre dicha superficie genera una señal de posición del rayo de radiación electromagnética (30, 44);
 - 15 e. un dispositivo de control de posición (23) acoplado a dicho al menos un elemento óptico, donde dicho dispositivo de control de posición responde a dicha señal de corrección de la dirección del rayo de radiación electromagnética (46) para controlar direccionalmente dicho elemento óptico (24) para alinear dicho rayo de radiación electromagnética con dicho objetivo.
- 20 2. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 1, donde dicho detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética (28) muestrea una parte de dicho rayo de radiación electromagnética en una posición entre dicho al menos un elemento óptico y dicho objetivo.
- 25 3. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 1, donde dicho detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética (43) muestrea una parte de dicho rayo de radiación electromagnética después de la incidencia de dicho rayo de radiación electromagnética sobre dicho objetivo.
- 30 4. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo como se describe en las reivindicaciones 2 o 3, donde dicho detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética comprende un detector de fotodiodo de cuadrante.
- 35 5. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una corriente de fluido, donde dicho objetivo (22) comprende una posición en dicha corriente de fluido, y donde dicho rayo de radiación electromagnética se alinea con dicha posición en dicha corriente de fluido.
- 40 6. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 5, que comprende adicionalmente partículas arrastradas en dicha corriente de fluido, donde dicho rayo de radiación electromagnética alineado con dicha posición en dicha corriente de fluido irradia al menos una de dichas partículas arrastradas en dicha corriente de fluido.
- 45 7. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una boquilla (48) que tiene una abertura de boquilla, donde dicha corriente de fluido sale a través de dicha abertura de boquilla.
- 50 8. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 7, que comprende adicionalmente:
 - a. un segundo elemento óptico al que dicho rayo de radiación electromagnética emitido desde dicha fuente de emisión de radiación electromagnética responde direccionalmente;
 - 55 b. un segundo detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética que tiene una superficie posicionada para recibir una parte de dicho rayo de radiación electromagnética, donde la incidencia de dicha porción de dicho rayo de radiación electromagnética sobre dicha superficie genera una señal de corrección de dirección del rayo de radiación electromagnética; y
 - c. un segundo dispositivo de control de posición acoplado a la dicho segundo elemento óptico, donde dicho segundo dispositivo de control de posición responde a dicha señal de corrección de dirección del rayo de radiación electromagnética para alinear automáticamente dicho rayo de radiación electromagnética sobre dicho objetivo.
- 60 9. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 7, donde el detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética muestrea una parte de dicho rayo de radiación electromagnética en una posición entre dicho al menos un elemento óptico y dicho objetivo.
- 65 10. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 1, donde dicho detector de la dirección del rayo de radiación electromagnética muestrea una parte de dicho rayo de radiación electromagnética después de la incidencia de dicho rayo de radiación electromagnética sobre dicho objetivo.

11. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:

- 5 a. un elemento de polarización de radiación electromagnética (40);
- b. un rayo de radiación electromagnética emitido desde dicho objetivo coaxial a dicha ruta de excitación que responde a dicho elemento de polarización de radiación electromagnética;
- c. un elemento reflectante sensible a la polarización (41) que refleja dicho rayo de radiación electromagnética emitido desde dicho objetivo polarizado por dicho elemento de polarización de radiación electromagnética; y
- 10 d. un dispositivo de captura de representación de imagen (52) que responde a dicha radiación electromagnética emitida desde dicho objetivo polarizada por dicho elemento de polarización de radiación electromagnética.

12. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 6, que comprende adicionalmente:

- 15 a. un elemento de iluminación (47) posicionado para proporcionar la iluminación de dicha corriente de fluido;
- b. una pantalla de imagen (33) incidente a la emisión de radiación electromagnética generada por dicha partícula y dicha iluminación de dicha corriente de fluido;
- c. una imagen generada en dicha pantalla de imagen de dicha emisión de radiación electromagnética generada por dicha partícula y dicha iluminación de dicha corriente de fluido;
- 20 d. al menos una abertura de la pantalla de imagen (34) a través de la cual pasa al menos parte de dicha emisión de radiación electromagnética generada por dicha partícula;
- e. un receptor (14) incidente a dicha al menos parte de dicha emisión de radiación electromagnética generada por dicha partícula; y
- 25 f. un dispositivo de captura de representación de imagen (31) que responde a dicha imagen generada en dicha pantalla de imagen, donde dicho dispositivo de captura de representación de imagen genera una señal de posición del rayo de radiación electromagnética.

13. Un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:

- 30 a. al menos un elemento de almacenamiento de memoria que responde a dicha señal de posición del rayo de radiación electromagnética;
- b. un elemento de recuperación para recuperar dicha señal de posición del rayo electromagnético a partir de dicho al menos un elemento de almacenamiento de memoria;
- 35 c. un elemento de análisis de la señal de posición del rayo electromagnético; y
- d. un controlador que proporciona la señal de corrección de la posición del rayo de radiación electromagnética para posicionar los dispositivos de control acoplados a dicho al menos un elemento óptico.

14. Un citómetro de flujo, que comprende:

- 40 a. una boquilla (42) que tiene una abertura de boquilla;
- b. una corriente de fluido que sale de dicha boquilla a través de dicha abertura de boquilla;
- c. un generador de gotitas al que dicha corriente de fluido responde formando gotitas, donde dichas gotitas tienen un punto de desprendimiento a una distancia de dicha abertura de boquilla;
- 45 d. un sistema de alineación óptica de citómetro de flujo de acuerdo con la reivindicación 1; donde el rayo de radiación electromagnética tiene una ruta a través de dicha corriente de fluido entre dicha abertura de boquilla y dicho punto de desprendimiento y donde el objetivo está localizado donde el rayo pasa a través de la corriente de fluido.

50 15. Un método para el control de dirección de un rayo de radiación electromagnética de un citómetro de flujo, que comprende las etapas de:

- a. emitir un rayo de radiación electromagnética que responde direccionalmente a un elemento óptico;
- 55 b. muestrear una parte de dicho rayo de radiación electromagnética en una superficie posicionalmente sensible a la incidencia de dicho rayo de radiación electromagnética;
- c. generar una señal de posición del rayo de radiación electromagnética que corresponde a la posición de dicha incidencia de dicho rayo de radiación electromagnética sobre dicha superficie;
- d. analizar dicha señal de posición del rayo de radiación electromagnética;
- e. determinar el error de alineación de dicho rayo de radiación electromagnética con un objetivo;
- 60 f. generar una señal de corrección de la dirección del rayo de radiación electromagnética; y
- g. ajustar dicho elemento óptico para corregir el error de alineación de dicho rayo electromagnético con dicha posición objetivo.

65 16. Un método para el control de dirección de un rayo de radiación electromagnética de un citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 15, que comprende adicionalmente la etapa de hacer correr un fluido a través de dicha posición objetivo.

17. Un método para el control de dirección de un rayo de radiación electromagnética de un citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 15, que comprende adicionalmente la etapa de arrastrar al menos una partícula en dicho fluido, donde dicho rayo de radiación electromagnética irradia dicha partícula en dicha posición objetivo.

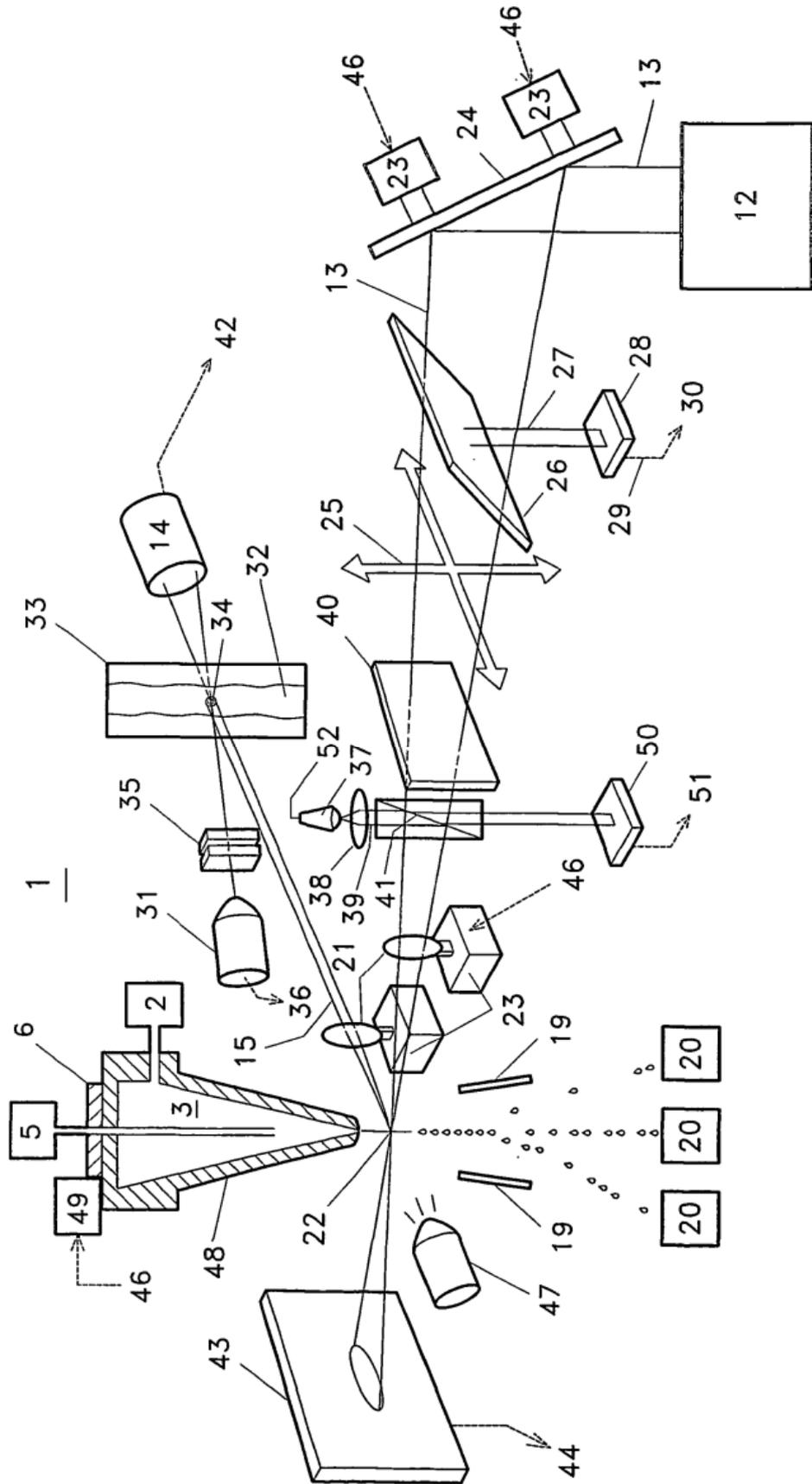


Figura 1

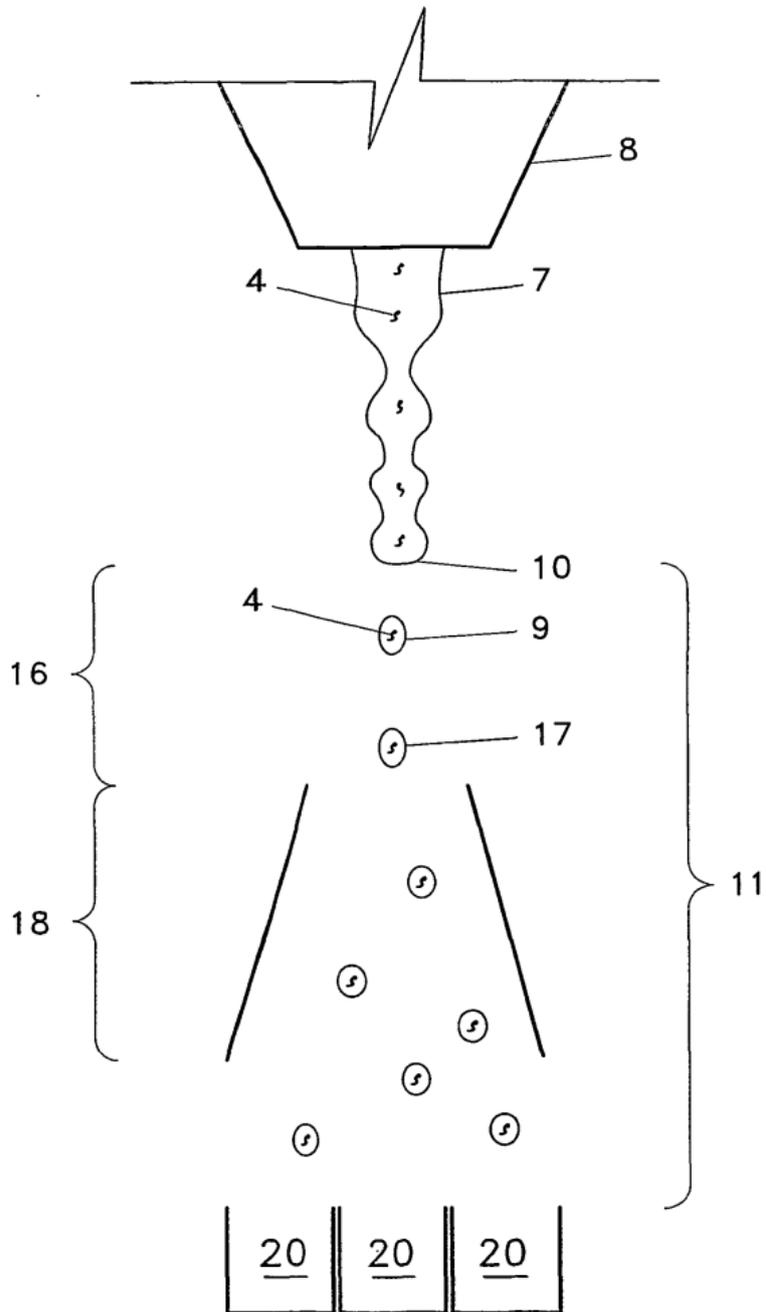


Figura 2

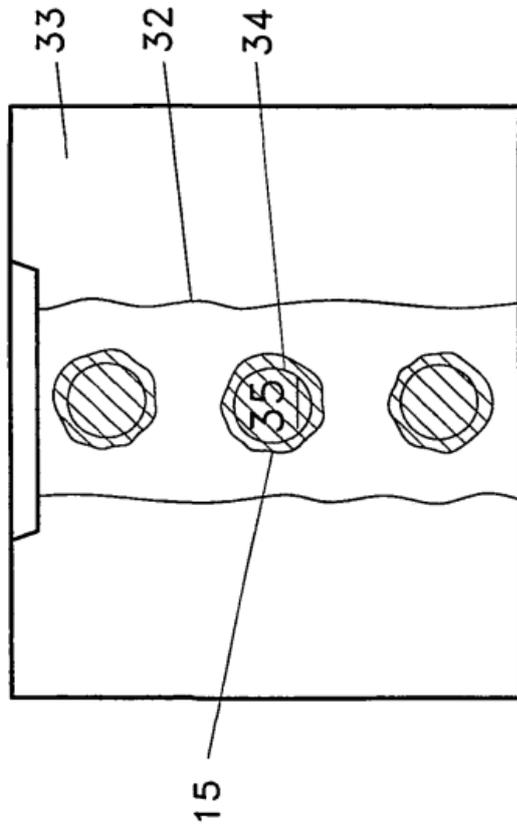


Figura 3

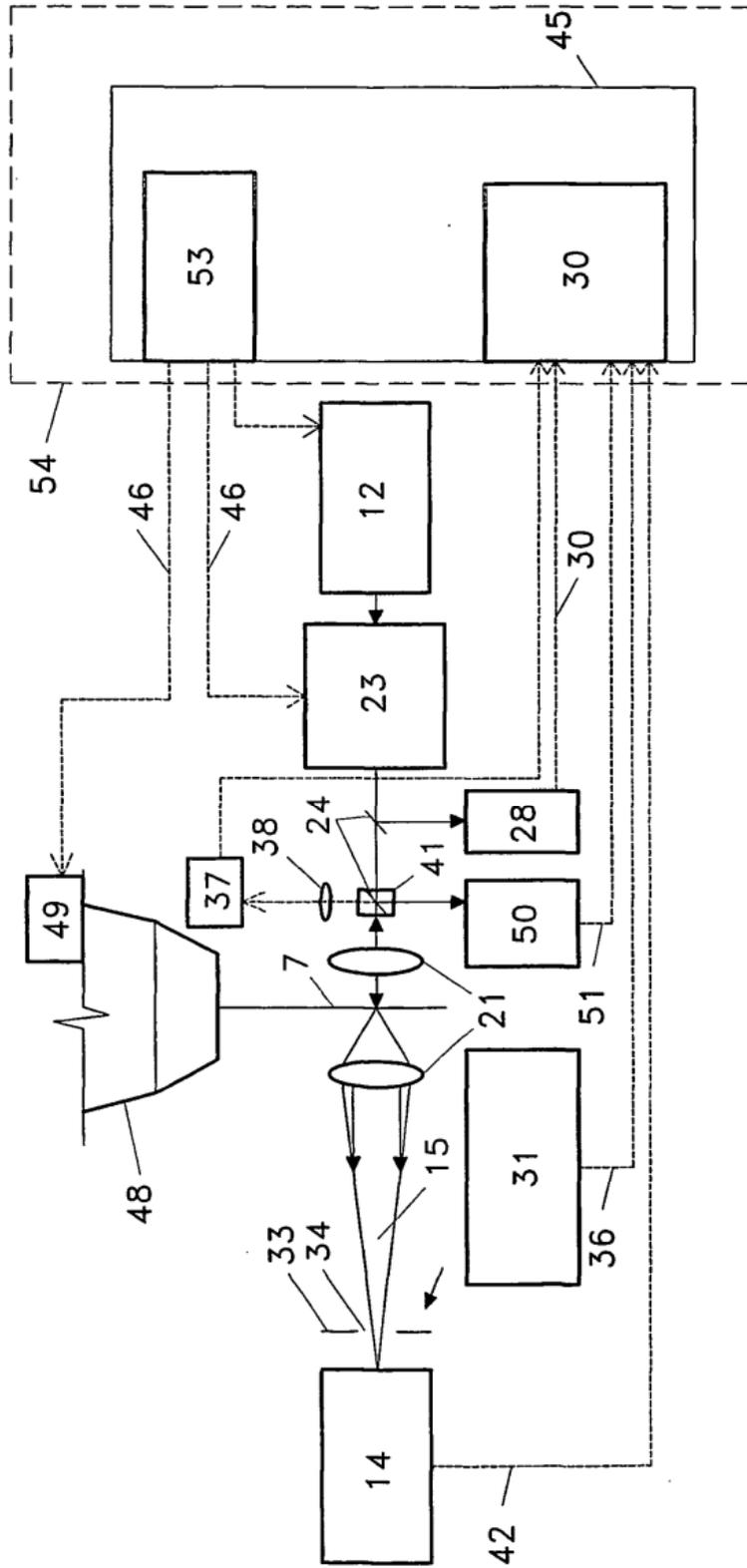


Figura 4

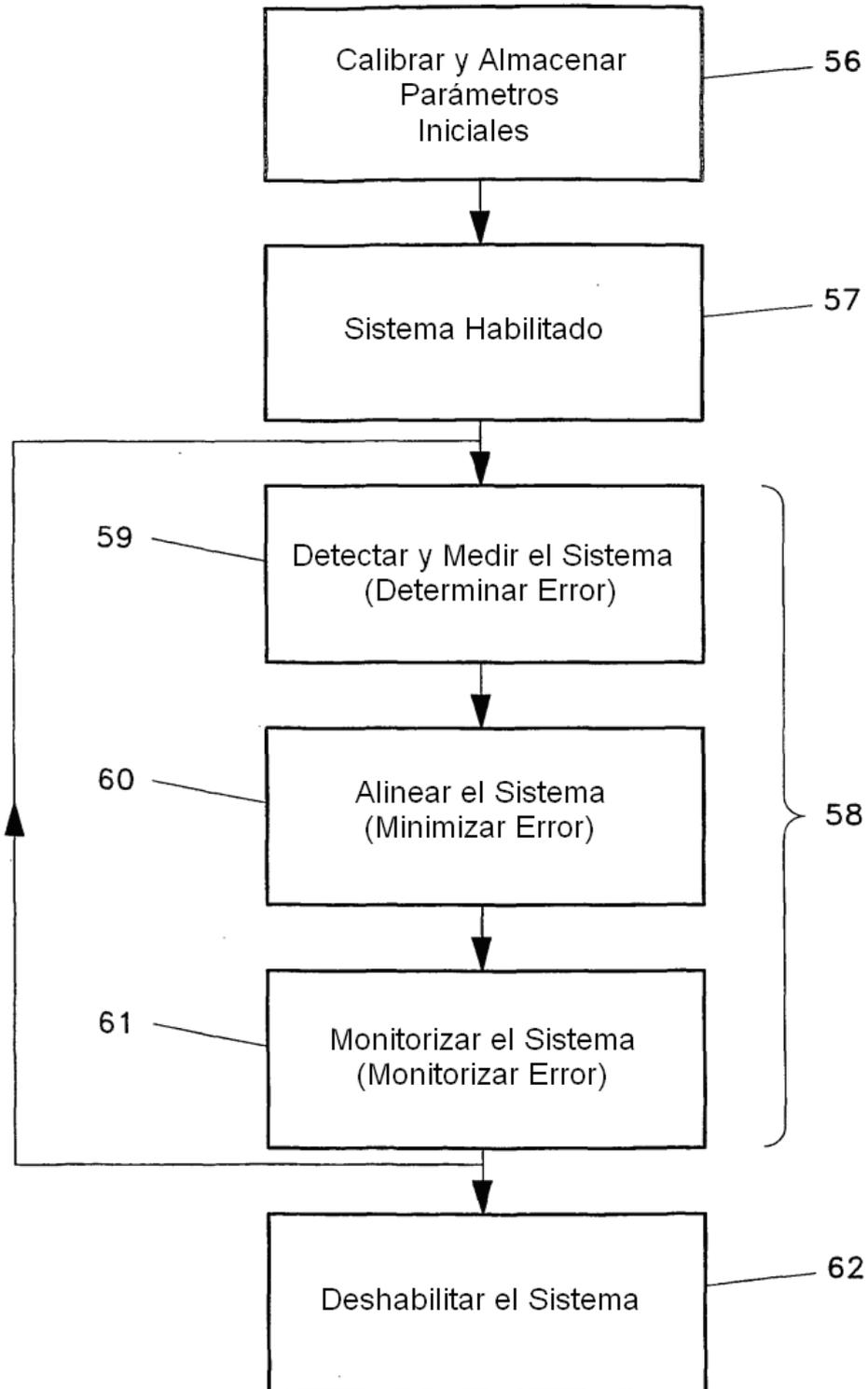


Figura 5