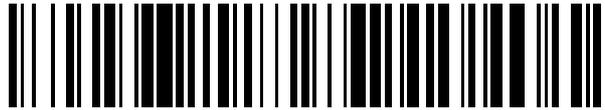


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 393**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2002 E 02801817 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1446652**

54 Título: **Citómetro**

30 Prioridad:

26.10.2001 AU PR846501

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

19.12.2013

73 Titular/es:

**BTF PTY LTD. (100.0%)
UNIT 1, 35-41 WATERLOO ROAD
NORTH RYDE, NSW 2113, AU**

72 Inventor/es:

**VESEY, GRAHAM;
GAUCI, MARK;
BEGINI, PAUL y
HERMANN, NICHOLAS**

74 Agente/Representante:

MORGADES MANONELLES, Juan Antonio

ES 2 435 393 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

5 **CAMPO TÉCNICO**

La presente invención se refiere a citómetros modificados y, en particular, a citómetros que permiten formar y recoger gotas de líquido que contienen un número predeterminado de partículas.

10 **ANTECEDENTES**

La citometría de flujo se utiliza para medir cuantitativamente las características físicas o químicas de las partículas de muestras líquidas tal como se presentan en un haz de luz enfocado. Normalmente, ello se realiza enfocando el haz de luz, generado por una lámpara de vapor de mercurio o un láser, en un flujo continuo de líquido, conocido como líquido envolvente, que contiene muestras de partículas que se inyectan en el líquido envolvente como flujo laminar estrecho. El líquido envolvente pasa a través de una celda de flujo en la que se canaliza en un flujo fino comprendido normalmente entre 50 y 250 μm de diámetro. El haz de luz se enfoca en la corriente mientras se encuentra dentro de una zona de cuarzo de la celda de flujo o bien una vez el flujo ha salido de la celda de flujo. Ello se conoce como análisis "en cuarzo" o análisis "en aire", respectivamente. El punto en el que la luz / láser toca la corriente se conoce como zona de interacción.

A medida que las partículas pasan a través de la celda de flujo, entran en el haz de luz y dispersan la luz. La óptica de captación dirige la luz dispersada por las partículas y la luz de fluorescencia emitida por las partículas hacia diversos detectores de luz. Todas estas mediciones de la dispersión de la luz y de la fluorescencia se pueden realizar simultáneamente en una sola partícula. Los datos para cada parámetro se envían normalmente en tiempo real desde el citómetro de flujo a un ordenador.

La velocidad del flujo de líquido a través del haz enfocado es por lo general aproximadamente de 10 ms^{-1} lo que permite analizar un máximo de aproximadamente de 2.000 a 10.000 células o partículas por segundo.

Además del análisis de citometría de flujo descrito anteriormente, la citometría de flujo se puede utilizar para clasificar células físicamente, utilizando la información de diversos detectores como discriminadores. La clasificación permite la purificación de un tipo de célula particular a partir de una mezcla. El método estándar de clasificación celular por citometría de flujo se conoce como clasificación por desviación de gotículas. Se basa en la utilización de un transductor piezoeléctrico en la celda de flujo para crear gotículas de líquido envolvente. Se pasa corriente eléctrica alterna a través del transductor, lo que provoca que la celda de flujo vibre hacia arriba y hacia abajo en la misma frecuencia que la corriente. La vibración de la celda de flujo provoca que se formen ondulaciones en el líquido envolvente una vez ha abandonado la celda de flujo. A medida que la corriente se aleja de la celda de flujo, las ondulaciones de la corriente de líquido envolvente se vuelven cada vez más definidas, hasta que se rompe la corriente en gotículas. La última ondulación en la corriente antes de que la corriente se rompa en gotículas se conoce como última gotícula retenida.

Si se va a recoger una partícula, se dispone una carga eléctrica en el líquido envolvente en el momento exacto en que la partícula se encuentra en la última gotícula retenida. La carga se produce durante mientras dura una vibración del cristal piezoeléctrico del transductor. Con ello se produce una única gotícula, que contiene la partícula a clasificar, cargándose. Al circular desde la celda de flujo, la circulación de gotículas pasa entre dos placas, una con carga positiva y una con carga negativa. Cuando la gotícula cargada pasa entre las placas, se desvía de la corriente principal de las gotículas, lo que permite recoger las mismas. Dicho procedimiento de clasificación se puede realizar a una velocidad de varios miles de veces por segundo utilizando un citómetro actual.

Sin embargo, los citómetros de flujo que utilizan la clasificación por desviación de gotículas son instrumentos sofisticados que requieren, por lo menos, que un usuario muy experto los alinee diariamente. La configuración de la clasificación resulta asimismo difícil y requiere diversas calibraciones, entre ellas calcular el período tiempo que tarda una partícula para viajar desde la zona de interacción hasta la última gotícula retenida. Dicho período de tiempo se conoce como retardo de las gotículas. Una vez se ha configurado la clasificación, se debe controlar atentamente para garantizar que no cambia el retardo de la gotícula.

Una limitación de la clasificación por desviación de la gotícula es que no permite crear gotículas que contengan más de una partícula. Un problema adicional con la clasificación por desviación de la gotícula es que puede crear aerosoles y, por lo tanto, no es apta para analizar muestras biológicamente peligrosas. Las dificultades con la utilización de la clasificación por retardo de la gotícula han limitado el uso de la tecnología a los laboratorios de investigación especializados.

Un modo alternativo de clasificación mediante citometría de flujo se describe en el documento US n.º 5.030.002 "Método y aparato para clasificar partículas con un tubo de captura móvil". Dicho procedimiento de clasificación utiliza un tubo de captura que se mueve mecánicamente dentro y fuera de la corriente de muestra para capturar una

partícula. El citómetro se realiza a partir de un alojamiento que presenta una parte superior y una parte inferior, que se conforma para formar una boquilla. La parte inferior del alojamiento se acopla a un recipiente que contiene un líquido de muestra a analizar. En su utilización, el líquido de muestra se bombea hacia el alojamiento a través de un tubo utilizando una bomba. Además, el alojamiento se conecta a una fuente de líquido envolvente, que se bombea hacia el alojamiento a lo largo de un tubo utilizando una bomba. La parte superior del alojamiento se conecta a través de un tubo a un recipiente de residuos para capturar el líquido envolvente residual. La parte superior del alojamiento se adaptada para alojar un tubo de captura. El tubo de captura es móvil entre unas posiciones primera y segunda mediante un accionador, tal como un solenoide o similar. El tubo de captura se acopla a través de un conducto de silicona hasta un recipiente que recoge la muestra producida en una corriente de líquido. Para poder analizar el líquido de muestra, el citómetro comprende un sistema de detección constituido sustancialmente a partir de una fuente de radiación tal como un láser y uno o más detectores. El sistema de detección se adapta para detectar propiedades de las partículas que circulan a través de una zona de interacción. En su utilización, el sistema funciona para analizar las partículas individuales contenidas en el líquido de muestra. Ello se realiza bombeando el líquido de muestra por el tubo hasta el alojamiento. Simultáneamente, el líquido envolvente se bombea hacia el alojamiento a través del tubo. El líquido envolvente se bombea hacia el alojamiento a presión para generar una corriente de líquido enfocada que rodee el líquido de muestra. Al impulsar el líquido envolvente y el líquido de muestra a través de la boquilla, ello provoca que el líquido de muestra forme una corriente fina que contiene una corriente laminar de partículas individuales de la muestra. Al pasar las partículas de muestra a través de la zona de interacción, el sistema de detección funciona para analizar una o más propiedades de cada célula o partícula. A continuación se transfiere una señal mediante un sistema de control hacia el accionador para controlar la posición del tubo de captura. En su utilización, cuando el tubo de captura se encuentra en una primera posición, las partículas contenidas en la corriente laminar se dirigen a través del tubo de captura a un recipiente de recogida. Cuando el tubo de captura se encuentra en una segunda posición, la corriente laminar que contiene partículas se dirige hacia el recipiente de residuos. Por consiguiente, ello permite que el sistema clasifique las partículas detectando determinadas propiedades de las partículas y a continuación dirigiendo las partículas en un recipiente de recogida o en el recipiente de residuos.

En muchos casos, sin embargo, se pretende poder producir unas cantidades predeterminadas y, en particular, una concentración predeterminada de partículas en una muestra y ello generalmente no resulta posible con esta disposición. En particular, incluso cuando se dispone el accionador en la segunda posición, el líquido envolvente se transmite todavía a través del tubo de captura y el conducto hacia el recipiente de recogida. Por consiguiente, resulta muy difícil dirigir un número predeterminado de partículas hacia el recipiente de recogida y mantener la concentración pretendida de partículas.

Por ejemplo, este procedimiento de clasificación lo utiliza el citómetro de flujo FACSCalibur™ de Becton Dickinson. Dicho citómetro de flujo es simple de manejar y no requiere calibración ni debe realizarse un procedimiento de configuración complejo previo a la clasificación de partículas. Se trata simplemente de poner en funcionamiento el instrumento, analizar una muestra y clasificar las partículas de interés en un volumen de recogida relativamente grande.

El citómetro de flujo FACSCalibur™ presenta un tramo del conducto de silicona (línea de clasificación) conectado al tubo de captura en la parte superior de la celda de flujo. Las partículas clasificadas mediante el tubo de captura descienden por esta línea de clasificación hacia el tipo pretendido de recipiente de recogida. Tal como se ha descrito anteriormente, existe un flujo constante de líquido envolvente desplazándose a través de la línea de clasificación que transporta las partículas clasificadas hacia el recipiente de recogida. Dicho flujo constante de líquido envolvente se debe recoger junto con las partículas clasificadas obteniéndose partículas clasificadas contenidas en un gran volumen de líquido (normalmente de 1 a 50 ml, dependiendo de la duración del procedimiento de recolección). Por lo tanto, las partículas se deben concentrar a volúmenes muy inferiores antes de que se puedan analizar o visualizar con un microscopio.

Además, diversas aplicaciones de clasificación de células por citometría de flujo requieren que las partículas clasificadas se encuentren en un volumen pequeño de líquido. Por ejemplo, la preparación de muestras de control de calidad de partículas que contienen un número exacto de partículas en un volumen pequeño de líquido. En este caso, aunque un número predeterminado de partículas se puede dirigir a la línea de clasificación, las partículas tenderán a desplazarse a lo largo de la línea a velocidades distintas porque el flujo dentro de la línea no es laminar. El flujo es más lento en la proximidad de la pared de la línea debido a la fricción entre las moléculas de agua y la pared de la línea. Como resultado de ello, las partículas se vuelven dispersas en todo el líquido envolvente y, por lo tanto, no resulta posible controlar la concentración de las partículas recogidas en el recipiente.

El documento US n.º 5.030.002 describe asimismo la utilización de un filtro conectado a la línea de clasificación para capturar y concentrar las partículas clasificadas. Sin embargo, incluso utilizando dichas técnicas, el número de partículas contenidas en un volumen de muestra no se puede controlar adecuadamente.

Por consiguiente, no se puede utilizar el citómetro de flujo FACSCalibur™ para producir gotículas que contengan números exactos de partículas. Ello se debe a que la línea de clasificación de silicio se debe conectarse a la celda de flujo para alejar las partículas clasificadas de la celda de flujo hasta una posición en la que se puedan recoger.

Cuando las partículas clasificadas se desplazan a través del conducto, se dispersan y ya no se encuentran en una sola gota.

5 Se puede utilizar un citómetro de flujo que utilice la clasificación por desviación de gotículas para producir gotículas que contengan partículas individuales. Sin embargo, el tamaño de gotícula que se produce mediante un citómetro que utilice la desviación de gotículas se limita normalmente a menos de 400 µm de diámetro, lo que puede suponer unas desventajas significativas en muchas aplicaciones. Por ejemplo, la preparación de gotículas liofilizadas que contengan números exactos de partículas para aplicaciones de control de calidad requiere una gotícula liofilizada suficientemente grande para poder manipularse fácilmente y visible a simple vista. Las gotículas de un citómetro de desviación de gotículas no son suficientemente grandes para dicha aplicación. Además, no resulta posible producir gotículas con un citómetro de desviación de gotículas que contengan más de una partícula.

15 Por otra parte, la clasificación por desviación de gotículas es menos adecuada como procedimiento de producción que un citómetro de flujo que utilice un tubo colector para clasificar las partículas debido a las dificultades de calibración y configuración del citómetro de flujo de desviación de gotículas. En particular, un citómetro de flujo que utilice la clasificación por desviación de gotículas requiere un usuario muy cualificado y necesita un control continuo durante el procedimiento de clasificación.

20 Los presentes inventores han desarrollado modificaciones a un citómetro que permiten formar y recoger números definidos de partículas en diversos volúmenes pequeños de líquido.

SUMARIO DE LA INVENCION

25 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un citómetro de flujo configurado para formar una gota que contenga un número predeterminado de dos o más partículas que comprende:

- (a) unos medios para desplazar partículas en una corriente de flujo de líquido procedente de una fuente de líquido;
- (b) unos medios detectores o analizadores aptos para detectar o analizar las partículas de la corriente de flujo;
- 30 (c) una ruta de residuos dispuesta aguas abajo de los medios detectores o analizadores para la recepción de residuos líquidos;
- (d) una ruta de recogida dispuesta aguas abajo de los medios detectores o analizadores para la recepción de líquidos de recogida que contienen las partículas pretendidas;
- (e) una boquilla para gotículas que presenta una abertura de salida definida para dispensar una gota de un volumen definido que contiene un número predeterminado de dos o más partículas de la ruta de recogida; y
- 35 (f) unos medios de control para dirigir la corriente de líquido hacia la ruta de residuos o la ruta de recogida.

Preferentemente, los medios para desplazar las partículas en una corriente de flujo líquido son una bomba.

40 Preferentemente, los medios detectores o analizadores comprenden:

- (i) unos medios para proporcionar un haz de luz para iluminar las partículas de la corriente de flujo de líquido;
- (ii) unos medios para detectar la luz con respecto a cada partícula en movimiento y para asociar la luz detectada a una o más características de cada partícula y generar una señal correspondiente a la característica de la partícula (s); y
- 45 (iii) unos medios para recibir la señal.

Preferentemente, la ruta de residuos comprende un tubo de residuos dirigido a un sitio de recogida de residuos.

50 En una forma de realización preferida, la ruta de recogida comprende un tubo de captura que presenta un volumen definido.

En otra forma de realización preferida, la ruta de recogida comprende un tubo de captura que presenta un volumen definido y un tubo de recogida que presenta un volumen definido que pasa desde el tubo de recogida.

55 Preferentemente, los medios de formación de gotículas son una boquilla para gotículas que presenta una abertura de salida definida que puede dispensar una gota con un volumen definido que contiene dos o más partículas. La boquilla para gotículas se puede disponer sustancialmente en un extremo del tubo de captura aguas abajo del detector o analizador. Alternativamente, la boquilla para gotículas se puede disponer sustancialmente en un extremo del tubo de recogida aguas abajo del tubo de captura.

60 En una forma de realización, el citómetro comprende, además, una fuente secundaria de muestras que puede añadir líquido a o en los medios de formación de gotículas. Preferentemente, se añade la fuente secundaria de muestras a los medios de formación de gotículas mediante unos medios aptos de bomba. Los medios secundarios de muestras permiten añadir otros líquidos o materiales al líquido de recogida antes o durante la formación de la gota. Existen situaciones en las que se requieren añadir a las partículas materiales distintos de los que pasan a través de la corriente de flujo. La fuente secundaria de muestras permite añadir material que no podría pasar a través del

citómetro. Los ejemplos comprenden líquidos viscosos, tales como suero, partículas de color o materiales lábiles que pueden afectar negativamente a la función normal del citómetro. Se puede incorporar un mezclador a la boquilla de formación de gotas para ayudar en la mezcla de dos líquidos distintos.

5 El citómetro puede comprender además unos medios de captura de gotículas que pueden eliminar las gotas formadas por la boquilla para gotículas. En una forma de realización preferida, los medios de captura de las gotículas son una bomba de vacío dispuesta adyacente a la boquilla para gotículas.

10 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un citómetro de flujo configurado para formar una gota que contenga dos o más partículas que comprende:

(a) una fuente de líquido para generar una corriente de líquido que contiene partículas;

(b) un sistema de detección para detectar una o más propiedades de una partícula contenida en la corriente de líquido;

15 (c) un tubo de captura apto para recoger un número predeterminado de partículas y dirigir las partículas hacia una salida en un volumen predeterminado de líquido, presentando el tubo de captura una entrada para recibir selectivamente partículas de la corriente de líquido, pudiendo desplazarse el tubo de captura entre:

20 (i) una primera posición en la que las partículas contenidas en la corriente de líquido se reciben en la entrada y se dirigen hacia la salida, y

(ii) una segunda posición en la que las partículas no se reciben en la entrada;

(d) un sistema de control para controlar la posición del tubo de captura según las señales recibidas desde el sistema de detección para de este modo provocar la recogida del número predeterminado de partículas;

25 (e) una boquilla para gotículas que presenta una abertura de salida definida para dispensar una gota que contiene el número predeterminado de dos o más partículas de la ruta de recogida; y

(f) un selector para seleccionar las gotas de líquido que se presentan en la salida según las señales recibidas desde el sistema de detección.

30 El citómetro comprende preferentemente un sensor para detectar la salida de cada gota de la salida, siendo asimismo el selector apto para recoger selectivamente las gotas según las señales recibidas del sensor.

35 En una forma preferida, el citómetro comprende, o es apto para cooperar con, un sistema de procesamiento acoplado al sistema de detección, el sistema de control, el sensor y el selector, siendo el sistema de procesamiento apto para:

(i) realizar el seguimiento de la salida de una gota de líquido de la salida del tubo de captura utilizando el sensor;

(ii) provocar que el sistema de control desplace el tubo de captura hasta la primera posición para de este modo dirigir una partícula que presenta las propiedades seleccionadas hacia el tubo de captura;

40 (iii) repetir (ii) hasta que un número predeterminado de partículas se ha dirigido hacia el tubo de captura;

(iv) controlar la duración de (ii) y (iii) para garantizar de ese modo que el número predeterminado de partículas se encuentra contenido en una única gota de líquido;

(v) realizar el seguimiento de la salida de la gota de líquido de la salida del tubo de captura utilizando el sensor; y

45 (vi) provocar que el selector seleccione la gota de líquido.

El selector comprende normalmente:

un brazo colector;

un controlador para controlar la posición del brazo colector, siendo el brazo colector apto para desplazarse entre:

50 (i) una primera posición en la que las gotas de líquido se recogen mediante el brazo colector; y

(ii) una segunda posición en la que las gotas de líquido no se recogen mediante el colector.

55 La salida se dispone normalmente debajo de la entrada para permitir que las gotas del líquido caigan desde la salida por la acción de la gravedad. La primera posición del brazo colector se dispone preferentemente directamente debajo de la salida del tubo de captura, encontrándose la segunda posición separada lateralmente de la primera posición.

La boquilla para gotículas se puede disponer sustancialmente en un extremo del tubo de captura aguas abajo del detector o analizador.

60 Las gotas de líquido se seleccionan preferentemente cuando el brazo colector se encuentra en la segunda posición.

65 Preferentemente, se procesan las gotas de líquido seleccionadas para generar una muestra. En este caso, el tratamiento comprende normalmente sumergir las gotas de líquido en nitrógeno líquido para formar gotas congeladas de las muestras. Sin embargo, se pueden utilizar asimismo otros modos de procesamiento, tales como

disponer las gotas en un recipiente de muestras para crear una muestra que contenga un número predeterminado de partículas.

5 El tubo de captura comprende una trayectoria de flujo desde la entrada hacia la salida, presentando normalmente la trayectoria de flujo una longitud definida. Normalmente, una longitud definida inferior a aproximadamente 70 mm (lo que proporciona un volumen de aproximadamente 228 μl), preferentemente inferior a aproximadamente 50 mm de longitud (lo que proporciona un volumen de aproximadamente 90 μl). Una longitud más preferida es aproximadamente 32 mm (lo que proporciona un volumen de aproximadamente 170 μl). Se podrá apreciar que la longitud exacta de la trayectoria de flujo del tubo colector puede variar dependiendo de otros factores, tales como el diámetro de la trayectoria de flujo.

10 En otra forma de realización preferida, el citómetro de flujo no comprende realizar el seguimiento de las gotas formadas. En dicha forma de realización, se controla la duración de la formación de gotas desplazando el selector en forma de una línea de vacío que transporta líquido hacia los residuos.

15 Los citómetros según la presente invención son aptos para formar gotas de aproximadamente de 1 μl a 500 μl . Normalmente, las gotas contienen aproximadamente de 20 μl a 100 μl , más preferentemente las gotas son de aproximadamente 30 μl .

20 Los citómetros modificados según la presente invención son aptos para recoger números definidos de microorganismos tales como bacterias, levaduras, hongos, virus, plantas y células animales. Los citómetros son aptos asimismo para recoger números definidos de partículas tales como nódulos, esporas, quistes y ovoquistes. Los citómetros son asimismo aptos para recoger números definidos de partículas tales como nódulos que están recubiertos o contienen cantidades definidas de proteínas, glúcidos, fármacos, productos químicos o ácidos nucleicos. Alternativamente, las partículas pueden ser formas granulares de compuestos tales como proteínas, glúcidos, fármacos, productos químicos o ácidos nucleicos.

25 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para obtener una gota de líquido que presenta dos o más partículas de un tipo pretendido, comprendiendo el método:

- 30 (a) proporcionar un citómetro de flujo según el primer aspecto de la presente invención;
 (b) proporcionar una muestra que contenga partículas de la corriente de líquido;
 (c) detectar o analizar las partículas en la corriente de líquido;
 (d) dirección de un tipo pretendido de partícula hacia la ruta de recogida en un líquido de recogida;
 35 (e) pasar el líquido de recogida que contiene el tipo pretendido de partículas a través de la boquilla para gotículas; y
 (f) recoger el número predeterminado de dos o más partículas de un tipo pretendido en una gota.

40 A lo largo de la presente memoria, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender", o variaciones tales de la misma como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la incorporación de un elemento, número entero o etapa indicados, o un grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

45 Cualquier comentario de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se haya incorporado a la presente memoria se suministra únicamente con el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe considerarse como una admisión de que cualquiera o todas estos temas forman parte de la base de la técnica anterior o se trata de conocimientos generales comunes en el campo relacionado con la presente invención, tal como existían en Australia antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud.

50 Para comprender más claramente la presente invención, se describirán las formas de realización preferidas haciendo referencia a los dibujos y ejemplos siguientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 La figura 1 es un diagrama esquemático de un citómetro según la presente invención que presenta unos medios de formación de gotas dispuestos en un extremo de un tubo de captura.

60 La figura 2 es un diagrama esquemático de un citómetro adicional según la presente invención que presenta unos medios de formación de gotas dispuestos en un extremo de un tubo de captura conectados a un tubo de captura. El citómetro comprende asimismo unos medios para añadir líquido adicional a los medios de formación de gotas.

65 La figura 3 es un diagrama esquemático de la boquilla para gotículas que presenta una fuente secundaria de muestras que puede añadir líquido a o en los medios de formación de gotas junto con un mezclador para colaborar en la mezcla de dos líquidos distintos.

FORMA(S) DE REALIZACIÓN DE LA PRESENTE INVENCION

Un ejemplo de la presente invención se describirá a continuación haciendo referencia a la figura 1. Tal como se representa, un ejemplo de un citómetro de flujo de la presente invención utiliza un diseño similar al de un citómetro conocido en la técnica. Sin embargo, a diferencia de los citómetros de la técnica anterior, el alojamiento y sus componentes asociados se invierten de tal modo que el tubo de captura se encuentra en la parte inferior del aparato. El tubo de captura presenta una boquilla para gotículas dispuesta en el extremo distal del tubo de captura, lo que permite que el líquido recogido gotee o se dispense fuera del aparato en una gota.

Por consiguiente, en este ejemplo el citómetro comprende un alojamiento 31 que presenta una parte inferior 31 A y una parte superior 31 B. En su utilización, la parte superior del alojamiento 31 B se acopla a un recipiente 33 que contiene un líquido de muestra 34 que presenta uno o más tipos de partícula, a través de un conducto 35. Ello permite bombear el líquido de muestra 34 hacia alojamiento 31 B utilizando una bomba 36. El alojamiento 31 B se acopla asimismo a través de un conducto 37 a una bomba 38 que se utiliza para proporcionar una fuente de líquido envolvente.

La parte inferior del alojamiento 31 A se acopla mediante un conducto 39 a un recipiente de desechos 40 para capturar el líquido envolvente de residuos. El alojamiento 31 A se adapta asimismo para recibir un tubo de captura 41 que presenta una entrada 41 A y una salida 41 B. El tubo de captura 41 se puede desplazar entre las posiciones primera y segunda utilizando un accionador 42.

Para poder detectar las propiedades de las partículas contenidas en el líquido de muestra 34, el citómetro presenta un sistema de detección indicado de un modo general con la referencia numérica 46. El sistema de detección 46 comprende una fuente de radiación 46A y uno o más detectores 46B. El sistema de detección 46 funciona para detectar partículas a medida que se transmiten a través de una zona de interacción indicada de un modo general con la referencia numérica 47.

El citómetro de flujo se puede utilizar para analizar las partículas basándose en una o más características físicas preseleccionadas, tales como, por ejemplo, la absorción a una longitud de onda particular, la densidad, el magnetismo, el peso específico, la impedancia, la capacidad de dispersión de la luz, la luminiscencia o la fluorescencia. Además, el citómetro se puede aplicar junto un contador Coulter y la microscopía de Raman para analizar y clasificar las partículas.

Se dispone un fotodetector 46 para recibir la luz dispersada hacia adelante por cada partícula. Se puede detectar asimismo la fluorescencia, si se emite por partículas excitadas por la iluminación de la fuente de luz 46A. De un modo similar, se puede detectar la luz dispersada en distintas direcciones, además de la dirección de avance. En la citometría de flujo con excitación por láser, se captan normalmente tanto la fluorescencia como la dispersión de la luz de ángulo amplio con un ángulo cuyo eje de visión es de 90° con respecto al eje de excitación del haz de luz. Un eje de acceso de visión de 90° permite captar la fluorescencia y la dispersión en un ángulo amplio. Por lo tanto, la luz que viaja a lo largo del eje comprende tanto la dispersión de luz como la fluorescencia como componentes.

Para captar la fluorescencia y la dispersión de la luz en el ángulo de 90° del haz láser incidente, la dispersión de luz y la fluorescencia se deben separar o dividir. Para realizar dicha división, se utilizan filtros dicróicos o un divisor de haz para recibir tanto la luz dispersada como la fluorescencia en el ángulo de 90° y volver a dirigir cada uno de dichos componentes en direcciones distintas. Dicha nueva dirección de la dispersión de luz y de la fluorescencia permite captar la dispersión de luz y fluorescencia por separado, aunque ambas se originen en el ángulo de 90°.

Por ejemplo, se puede detectar la dispersión de la luz reflejada mediante un tubo fotomultiplicador. Si la fluorescencia comprende un cierto número de regiones distintas de colores, se puede utilizar un espejo dicróico para separar las diferentes longitudes de onda de los colores. De este modo, por ejemplo, la fluorescencia en la región del color verde se puede transmitir mediante un espejo dicróico lo largo del eje y recogerse en un fotodetector apto. Se pueden incorporar espejos dicróicos adicionales, tal como en el documento US n.º 4.662.742, para asociar los colores de fluorescencia a características adicionales de las células o partículas analizadas. Los expertos en la materia podrán apreciar que se pueden utilizar diversas lentes, filtros, barreras o similares junto con cada fotodetector adicional para obtener una señal tan pura como sea posible. La obtención de dichas señales ópticamente limpias es más conveniente en particular cuando se utilizan canales de fluorescencia y de dispersión de la luz.

Las señales eléctricas de los fotodetectores se alimentan normalmente como impulsos discretos a la electrónica del aparato para fines de visualización, almacenamiento o procesamiento adicional de tal modo que se pueden determinar o clasificar una o más características de las partículas a analizar. Si se pretende de este modo, se puede incorporar la electrónica en una consola de análisis.

Aunque se puede utilizar una única característica preseleccionada específica de una partícula dada para el análisis en este tipo de configuración, resulta posible asimismo utilizar la citometría de flujo de parámetros múltiples. En la

presente memoria "citometría de flujo de parámetros múltiples" significa la medida de diversas características de una partícula particular, para diferenciarla de otra.

5 Las técnicas disponibles para analizar partículas utilizando citometría de flujo se encuentran bien documentados en la técnica. Sin embargo, a título de ejemplo, cuando se pretende confiar en el análisis óptico, se puede mezclar una muestra que contenga partículas con uno o más colorantes, agentes fluorescentes o luminiscentes, o anticuerpos conjugados con dichos agentes, por ejemplo, antes del análisis mediante citometría de flujo de tal modo que las partículas específicas queden teñidas o marcadas. Un ejemplo de dicho proceso implica la utilización del colorante diacetato de fluoresceína, que tiñe específicamente células viables. Tras la tinción con diacetato de fluoresceína, se puede analizar la muestra y identificar las partículas viables individuales que se encuentran en una fase específica de su ciclo de vida.

15 En cualquier caso, en su utilización, el líquido de muestra 34 que contiene uno o más tipos de partícula se bombea a lo largo del tubo 35 hacia el alojamiento 31 B. En este punto, se añade líquido envolvente para proporcionar una corriente enfocada que rodee el líquido de muestra. Se impulsa la corriente a través de la abertura 32 del alojamiento 31 B para crear una corriente fina de entre 50 y 250 micrómetros de diámetro que comprende un flujo laminar de las partículas individuales de la muestra 34.

20 El líquido pasa a través de la zona de interacción 47, lo que permite medir las propiedades de las partículas individuales utilizando el sistema de detección 46. A continuación se utiliza el sistema de detección 46 para accionar el accionador 42, lo que permite que el tubo de captura 41 se desplace entre las posiciones primera y segunda. Cuando el tubo de captura 41 se encuentra en una primera posición, las partículas se recogen en la entrada del tubo de captura 41 A y se dirigen a través del tubo de captura 41. En cambio, cuando el tubo de captura se encuentra en una segunda posición, las partículas se dirigen a través del tubo 39 hacia el recipiente de residuos 40. Se apreciará que, en cualquier posición de captura, el líquido envolvente se dirige asimismo a lo largo del tubo de captura.

Unos medios de formación de gotas en forma de una boquilla para gotículas 70 se disponen en el extremo distal 41 B del tubo de captura 41. La boquilla para gotículas es apta para formar una gota con un volumen definido.

30 Por consiguiente, en su utilización, el citómetro se puede utilizar para crear muestras que contengan únicamente partículas con ciertas propiedades de un modo similar a los citómetros de la técnica anterior. Sin embargo, además, la trayectoria de flujo entre la entrada 41 A y la salida 41 B del tubo de captura 41 se limita normalmente a una longitud corta definida para definir un volumen pequeño. Normalmente, la longitud corta definida es inferior a 70 mm (lo que proporciona un volumen de aproximadamente 228 μl) y es preferentemente inferior a 50 mm de longitud (lo que proporciona un volumen de aproximadamente 90 μl), siendo la longitud más preferida de aproximadamente 32 mm (lo que proporciona un volumen de aproximadamente 170 μl). Como resultado de ello, cualquier partícula atrapada por el tubo de captura no se distribuye el líquido envolvente contenido en la trayectoria del flujo de tubo de captura. En cambio, las partículas tienden a aparecer en el mismo volumen pequeño de líquido envolvente en el que se capturaron.

40 Por consiguiente, ello permite capturar gotas individuales que contengan un número predeterminado de partículas. Para ayudar en esta función, el citómetro puede presentar, además u opcionalmente, un detector de gotas 50, un recipiente de muestras 51 y un receptor 52, que se acopla a un accionador 53.

45 El detector de gotas es normalmente un sistema de detección óptico que puede detectar las gotas de líquido que se crean en la salida 41 B. El detector de gotas es apto para cooperar con el colector 52, que se puede desplazar selectivamente entre una primera posición (representada con líneas normales) y una segunda posición (representada con líneas de puntos), para atrapar selectivamente las gotas.

50 Por consiguiente, cuando se pretende recoger una muestra que contenga un número predeterminado de partículas, el citómetro se configura para funcionar generando gotas de líquido que se capturan selectivamente a continuación mediante el receptor 52. Para ello, el citómetro se activa inicialmente con el tubo de captura 41 en una segunda posición de tal modo que no se recogen partículas, incluso partículas que contienen las propiedades pretendidas. Cuando el detector de gotas 50 detecta que una gota ha salido únicamente por la salida 41 B, el tubo de captura 41 se activa para capturar una partícula que presenta las propiedades pretendidas. Dicho procedimiento se repite hasta que se ha capturado el número predeterminado de partículas. Por lo tanto, en general, un solo movimiento del tubo de captura capturará únicamente una partícula, repitiéndose el movimiento rápidamente (hasta 300 veces por segundo) para capturar una pluralidad de partículas en una sola gota de líquido envolvente. Dichas partículas se capturan en el tubo de captura 41 y se dirigen a lo largo de la trayectoria de flujo hacia los medios de formación de gotas 70 en la salida 41 B. Las partículas y el líquido envolvente forman a continuación una nueva gota en los medios de formación de gotas 70 en la salida 41 B del tubo de captura 41. Se continúa con dicho procedimiento hasta alcanzar el número predeterminado de partículas capturadas por el tubo de captura 41. La gota continuará llenándose con líquido envolvente hasta que por último la gota presente un volumen suficiente y caiga del tubo de captura en los medios 41 B. Debido a que la longitud de la trayectoria de flujo del tubo de captura es únicamente pequeña, la longitud de recorrido es insuficiente para que las partículas se dispersen y distribuyan diversas gotas distintas. Por consiguiente, la gota creada contiene el número requerido de partículas. Por lo tanto, la captura es

apta para garantizar que un número predeterminado de partículas se puede capturar en un volumen predeterminado de líquido envolvente.

Se puede utilizar el colector 52 para permitir la recogida de las gotas creadas. Ello se puede realizar por ejemplo activando el accionador 53 para provocar que el colector 52 se desplace hasta la segunda posición, cuando cae la gota, lo que permite que el colector capture la gota. Sin embargo, un problema de dicha técnica es que resulta muy difícil manejar gotas individuales de líquido. En particular, cuando el colector 52 atrapa las gotas de líquido, resulta difícil extraer la gota de líquido del colector. Ello se puede ver favorecido si el colector presenta una superficie de baja fricción para ayudar en el suministro de gotas. Incluso con dicha modificación, es posible que quede un fragmento de la gota en el colector cuando se extrae la gota a continuación. Ello podría afectar al número de partículas contenidas en la gota, por lo que la muestra sería inutilizable.

Para evitar dicho problema, el recipiente de la muestra 51 se puede llenar con un líquido criogénico, tal como nitrógeno líquido o similar. En este caso, las gotas no pretendidas las recoge el colector y se eliminan. Se permite que las gotas que contienen las partículas pretendidas caigan en el recipiente de la muestra 51. El nitrógeno líquido provocará que se congele instantáneamente la gota de líquido para producir de este modo una gotícula congelada que contiene un número predeterminado de partículas.

A continuación se pueden retirar del nitrógeno líquido y secar las partículas congeladas según una técnica de secado conocida en la técnica. Por consiguiente, ello permite recoger las gotas congeladas que contienen un número pretendido de partículas.

En general, la temperatura del criógeno se debe seleccionar de tal modo que las partículas que se están recogiendo no estén dañadas. Por consiguiente, la temperatura del criógeno se seleccionará normalmente en función del tipo de partícula recogida (es decir, células, enzimas, proteínas o similares), así como de la variedad específica (es decir, la célula particular recogida).

Un ejemplo del procedimiento de liofilización se describe más detalladamente en el documento PCT/AU02/01216 titulado *Products Comprising Quantum of Bioparticles and Method For Production Thereof* ("Productos que comprenden cantidades específicas de biopartículas y método para la producción de los mismos"). El sistema se analizó utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur™ que se había invertido.

La figura 2 representa una disposición de una segunda forma de realización preferida de un citómetro de flujo según la presente invención que presenta un tubo de recogida unido a un tubo de captura. Dicha disposición se diferencia del ejemplo descrito anteriormente en que no es un instrumento invertido. Las referencias numéricas utilizadas son similares a las referencias numéricas de la figura 1 para los mismos elementos funcionales.

Por consiguiente, en el presente ejemplo el citómetro comprende un alojamiento 31 que presenta una primera parte 31A y una segunda parte 31B. En su utilización, la primera parte del alojamiento 31B se acopla a un recipiente 33 que contiene un líquido de muestra 34 que presenta uno o más tipos de partícula, a través de un conducto 35. Ello permite bombear el líquido de muestra 34 hacia alojamiento 31B utilizando una bomba 36. El alojamiento 31B se acopla asimismo a través de un conducto 37 a una bomba 38 que se utiliza para proporcionar una fuente de líquido envolvente.

La segunda parte del alojamiento 31 A se acopla mediante un conducto 39 a un recipiente de desechos 40 para capturar el líquido envolvente de residuos. El alojamiento 31A se adapta asimismo para recibir un tubo de captura 41 que presenta una entrada 41A. El tubo de captura 41 se puede desplazar entre las posiciones primera y segunda mediante un accionador 42.

Se introduce un tubo de acero inoxidable 60 en el tubo de captura 41 formando una ruta de recogida. El tubo de acero inoxidable 60 comienza en la entrada del tubo de captura 41A y finaliza en una boquilla para gotículas 70. Ello aumenta la longitud de la ruta de recogida y disminuye el diámetro interior del tubo de captura 41. La salida del tubo de captura 41 B se extiende hacia la boquilla para gotículas 70. La boquilla para gotículas 70 forma gotas que contiene el número pretendido de partículas en un volumen definido.

Para poder detectar las propiedades de las partículas contenidas en el líquido de muestra 34, el citómetro presenta un sistema de detección indicado de un modo general con la referencia numérica 46. El sistema de detección comprende una fuente de radiación 46A y uno o más detectores 46B. El sistema de detección 46 funciona para detectar partículas a medida que se transmiten a través de una zona de interacción indicada de un modo general con la referencia numérica 47.

El citómetro de flujo se puede utilizar para analizar las partículas basándose en un cierto número características físicas preseleccionadas, tales como, por ejemplo, la absorción a una longitud de onda particular, la densidad, el magnetismo, el peso específico, la impedancia, la capacidad de dispersión de la luz, la luminiscencia o la fluorescencia. Además, la presente invención se puede aplicar junto un contador Coulter y la microscopía de Raman para analizar y clasificar las partículas.

Aunque se puede utilizar una única característica preseleccionada específica de una partícula dada para el análisis en este tipo de configuración, resulta posible asimismo utilizar la citometría de flujo de parámetros múltiples. En la presente memoria "citometría de flujo de parámetros múltiples" significa la medida de diversas características de una partícula particular, para diferenciarla de otra.

En cualquier caso, en su utilización, el líquido de muestra se bombea a lo largo del tubo 35 hacia el alojamiento 31 B. En este punto, el líquido envolvente proporciona una corriente enfocada que rodea el líquido de muestra. Se impulsa la corriente a través de la abertura 32 para crear una corriente fina de entre 50 μm y 250 μm de diámetro que comprende un flujo laminar de las partículas individuales de la muestra.

El líquido pasa a través de la zona de interacción 47, lo que permite medir las propiedades de las partículas individuales utilizando el sistema de detección 46. A continuación se utiliza el sistema de detección 46 para accionar el accionador 42, lo que permite que el tubo de captura 41 se desplace entre las posiciones primera y segunda. Cuando el tubo de captura 41 se encuentra en una primera posición, las partículas se recogen en la entrada del tubo de captura 41 A y se dirigen a través del tubo de captura 41. En cambio, cuando el tubo de captura se encuentra en una segunda posición, las partículas se dirigen a través del tubo 39 hacia el recipiente de residuos 40. Se apreciará que, en cualquier posición de captura, el líquido envolvente se dirige asimismo a lo largo del tubo de captura.

Para permitir la adición de más líquido a la gota, una fuente secundaria de la muestra 80 que contiene la muestra líquida secundaria 82 se conecta a la boquilla para gotículas 70 a través del tubo de muestras secundario 84. La bomba secundaria de muestras 86 permite la adición de una cantidad definida de una muestra líquida secundaria 82 a la gota.

Para controlar el número de gotas formado y recogido, el citómetro comprende además unos medios de captura 90 en forma de bomba de vacío dispuesta en la proximidad de la boquilla para gotículas 70 en la posición 90A o se puede activar para disponerse alejada de la boquilla para gotículas 70 en la posición 90B. Los medios de captura 90 se activan cuando no es necesario recoger las gotas que se forman. Cuando una gota presenta el número o tipo de partícula requerido, los medios de captura 90 se inactivan y se forman gotas que caen en el recipiente requerido 51.

La boquilla para gotículas 70 se describirá más detalladamente con respecto a la figura 3. Un alojamiento de la boquilla 100 presenta la forma de un acoplador de plástico en el que se disponen tres agujas hipodérmicas. Una de las agujas hipodérmicas es el conducto de captura 60. Una segunda aguja hipodérmica 107 se conecta a una fuente secundaria de la muestra 80 que contiene la muestra líquida secundaria 82 conectada a la boquilla para gotículas 70 a través del tubo de muestras secundario 84. La bomba secundaria de muestras 86 permite la adición de una cantidad definida de una muestra líquida secundaria 82 a la gota.

Una aguja hipodérmica central 103 actúa como alojamiento para un alambre 104 que se utiliza para mezclar la gotícula. En el extremo inferior, el alambre se dobla formando un ángulo recto 105, al salir de la aguja hipodérmica central 104. El alambre 104 se conecta a un motor eléctrico 108 que girar el alambre a una velocidad de aproximadamente 900 rpm.

Por consiguiente, en su utilización, el citómetro se puede utilizar para crear muestras que contengan únicamente partículas con ciertas propiedades. Sin embargo, además, la trayectoria de flujo entre la entrada 41 A y la salida 41 B del tubo de recogida 60 se limita normalmente a una longitud definida y un diámetro interior definido. La longitud y el diámetro interior del tubo de captura 41 se controlan introduciendo el conducto 60 en el tubo de captura 41. La longitud y el diámetro interior del conducto 60 son importantes para producir gotas que contengan números definidos de partículas. La selección de la longitud correcta y el diámetro interior del conducto 60 permite las tres funciones siguientes:

- I. el caudal a través del tubo de captura 41 no debe limitarse en una medida tal que el líquido se desvíe hacia el depósito de residuos 51 en lugar del tubo de captura 41;
- II. la longitud del conducto debe ser suficiente para vaciar el citómetro de flujo;
- III. el diámetro interior no debe ser demasiado grande para que las partículas se diluyan en un volumen de líquido demasiado grande para formar una gota apta.

La longitud preferida del conducto 60 es de 170 mm con un diámetro interior de aproximadamente 241 μm . Esta longitud es suficiente para vaciar el citómetro doblando cuidadosamente el conducto en forma de U. Por consiguiente, el citómetro puede funcionar en su orientación normal. El conducto no debe retorcerse o doblarse formando ángulos agudos, ya que ello puede introducir turbulencias en el flujo de líquido dentro del conducto y provocando que las partículas clasificadas se dispersen a medida que se desplazan a través del conducto. Dicho conducto permite que las partículas clasificadas se formen en una gotícula en la boquilla de formación de gotículas 70.

Una longitud más corta de conducto funcionará correctamente pero puede ser difícil vaciar el citómetro sin deformar el conducto.

Si el diámetro interior del conducto es inferior a aproximadamente 112 μm , el tubo de captura no puede capturar las partículas pretendidas. Un diámetro muy pequeño del conducto puede limitar el flujo de líquido hacia el tubo de captura de tal modo que el líquido se desvíe hacia el recipiente de residuos. Ello provoca que las partículas pretendidas entren en el recipiente de residuos y se pierdan.

Si el diámetro interior de la tubería es superior a aproximadamente 350 μm , las partículas clasificadas pueden distribuir en un volumen de líquido demasiado grande para formar en una sola gota.

El control preciso de la duración de la clasificación y de formación de la gota es importante para garantizar que la gota contiene el número definido de partículas. Se envía una señal al citómetro para comenzar a clasificar el número definido de partículas. Se produce un retardo de aproximadamente 50 ms durante el cual el citómetro se prepara para iniciar la clasificación. A continuación el citómetro inicia la clasificación de las partículas a una velocidad de aproximadamente 250 por segundo. Las partículas clasificadas se desplazan por el conducto de captura hacia la boquilla de formación de gotas. Resulta importante que los medios de recepción se desplacen fuera de la boquilla y permitan que empiece a formarse la gota inmediatamente antes de que las partículas clasificadas alcancen la boquilla de formación de gotas. Si los medios de recepción se desplazan demasiado tarde, se perderán las partículas clasificadas y no se encontrarán en la gota. Si los medios de recepción se desplazan demasiado pronto y la gota se empieza a formar antes de que las partículas clasificadas hayan alcanzado sustancialmente la boquilla, se puede completar la formación de la gota antes de que todas las partículas clasificadas hayan alcanzado la boquilla. Ello provocaría la separación de la gota antes de que todas las partículas clasificadas se encuentren en la gota. La formación y la rotura de la gota tarda aproximadamente 0,66 s.

El procedimiento de clasificación implica un retardo de aproximadamente 50 ms y a continuación un período de clasificación de aproximadamente 4 ms por partícula. Por lo tanto, el período requerido para clasificar 30 partículas es de aproximadamente 170 ms. Puesto que las partículas clasificadas se desplazan por el conducto de captura que forma la ruta de recogida hacia la boquilla de formación de gotas, las partículas tienden dispersarse por la turbulencia en el conducto. La cantidad de dispersión varía en función del diámetro interior del conducto de captura y la longitud del conducto de captura. El período que tardan las partículas alcanzar la boquilla de formación de gotas depende asimismo del diámetro interno del conducto de captura y la longitud del conducto de captura.

Cuando se utiliza el conducto de captura preferido con una longitud de 170 mm y con un diámetro interior de 241 μm , las partículas alcanzan la boquilla de formación de gotas con las partículas primera y última separadas aproximadamente 250 ms. Las partículas clasificadas tardan aproximadamente 50 ms en desplazarse a través de dicho conducto de captura.

Para producir una gota que contenga 30 partículas clasificadas utilizando el conducto de captura preferido, los medios de captura se deben desplazar fuera de la boquilla de formación de gotas antes de 100 ms. Normalmente se utiliza un retardo de 50 ms.

Una forma de realización alternativa de la presente invención utiliza un clasificador electrostático para formar gotas que contengan más de una partícula. Los clasificadores electrostáticos tales como un Becton Dickenson Facstarplus™, un Becton Dickenson Advantage o un Coulter Elite permiten clasificar las partículas en pequeñas gotas de líquido. Sin embargo, no resulta posible producir gotas que contengan más de una partícula. El dispositivo de formación de gotas desarrollado por los presentes inventores se podría utilizar para recoger una pluralidad de gotas procedentes de un clasificador electrostático y formar con las mismas una sola gota.

A continuación se describen unos ejemplos de utilización de dos citómetros según la presente invención.

Ejemplo 1

Instrumentación

El citómetro era un citómetro de flujo FACSCalibur™ modificado tal como se representa en la figura 1. El instrumento se invirtió utilizando una estructura de aluminio que aloja el citómetro de flujo FACSCalibur™. Se retiró la tapa del citómetro de flujo y se atornilló la parte inferior del citómetro con la estructura y a continuación se invirtieron la estructura y el citómetro. El instrumento pudo de formar gotas que contenían dos o más partículas.

Se dispuso un sensor óptico (Festo, Sídney) directamente debajo de la salida del tubo de captura y se ajustó para permitir la detección de gotas a medida que se formaban en el extremo del tubo de captura. En la formación de una gotícula, se activa el sensor óptico enviando una señal de impulso a través de un Controlador Lógico Programable (PLC) modelo FC-30 (Festo) a un retardador de la retención y habilitando el mismo y enviando asimismo una señal de impulso a un ratón Macintosh modificado tal como se describe en el documento WO 01/68902 para captar los datos clasificados. El período en que las partículas clasificadas se desplazaron desde la zona de inspección de la celda de flujo hasta el punto de salida del receptor se indicó como el retardo del receptor. Una vez determinado el retardo del receptor, se retiró el brazo receptor de la trayectoria de la gota y se estableció un retardo del brazo

receptor. El brazo receptor se diseñó como un sistema de residuos de vacío para la salida gotas no pretendidas. El período que tarda una sola gota a pasar el brazo colector se indicó como retardo del brazo receptor. Una vez determinado el retardo del brazo receptor, se reinicia el ciclo y se vuelve a habilitar el sensor óptico.

- 5 Se invierten el recipiente de la muestra, el recipiente que contiene el líquido envolvente y el contenedor de residuos de tal modo que los depósitos de residuos se encuentran en posición vertical. Se retiraron la cubierta de óptica y la línea de clasificación. Se rellenó el depósito de líquido envolvente con agua Milli-Q.

Análisis de la Escherichia coli

- 10 Se cultivó una cepa de *E. coli* (ATCC 11775) agitando enérgicamente un matraz de caldo nutritivo a 37 °C durante 5 horas. Se diluyó la muestra hasta 1 en 1000 una disolución salina amortiguada de fosfato (PBS) (0.22 µM). Se recogió una muestra de 200 µl de *E. coli* en una punta de pipeta que se unió a la varilla de introducción de la muestra a través de un conducto de silicio de 4 mm de longitud. Se cerró herméticamente en un extremo un conducto de silicio de 150 mm de longitud con un diámetro interior de 10 mm y a continuación se dispuso sobre la varilla de introducción de muestras. Ello permitió que el citómetro presurizase la muestra.

Se utilizó el citómetro con los detectores ajustados en los siguientes niveles de sensibilidad:

20	Dispersión frontal	E002
	Dispersión lateral	500

Se utilizó la dispersión lateral como umbral a un valor de 350.

- 25 Se definió una zona que contenía la *E. coli* en un gráfico de dispersión donde se representaba la dispersión lateral con respecto a la dispersión frontal. A continuación se utilizó dicha zona para clasificar la *E. coli*.

Clasificación de la *E. coli*

- 30 Se ajustó el citómetro para clasificar 30 células de *E. coli*. Se ajustaron el caudal y la concentración de *E. coli* para garantizar que la velocidad de clasificación se encontrase entre 150 y 200 clasificaciones por segundo.

- 35 La gotícula que se formó inmediatamente tras completar la clasificación se recogió en placas nutritivas de agar, se extendió con una varilla de plástico estéril en forma de L y se incubó a 37 °C durante la noche. Se detectaron 30 colonias de *E. coli* en las placas de agar.

Ejemplo 2

Instrumentación

- 40 Se modificó un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScalibur™ tal como el citómetro representado en la figura 2 y la figura 3. Se calibró el citómetro permitir dispensar 30 esporas de *Bacillus cereus* en una sola gota. Se inyectó suero en la gotícula mientras se formaba para permitir la producción de la gotícula que se liofilizó en una bola sustancialmente esférica.

- 45 La modificación implicó introducir en el tubo de captura de la celda de flujo un conducto hipodérmico de una longitud de 40 mm con un diámetro exterior de 296 µm y un diámetro interior de 165 µm (A-M Systems, Calsborg, EE.UU.). Un conducto de silicio con una longitud de 265 mm y con un diámetro interior de 165 µm se conecta a la aguja hipodérmica (AM System, Calsborg, EE.UU.). Un conducto hipodérmico con una longitud de 30 mm y con un diámetro interior de 165 µm se conecta al otro extremo del conducto de silicio (AM System, Calsborg, EE.UU.). Dicha modificación permitió capturar una gota de aproximadamente 27 µl. La gota se formó en una boquilla para gotículas que comprendía un accesorio dentado de polipropileno de 5 mm (Becton Dickinson, San José, EE.UU.) en el que se introdujo la aguja hipodérmica desde el citómetro. Cuando se puso el citómetro en funcionamiento, se formaron gotas en el extremo del conducto hipodérmico de la boquilla.

- 55 Se utilizó una bomba peristáltica (Cole Parmer Instruments, Illinois, EE.UU.) para inyectar suero de caballo a través de un conducto hipodérmico de 300 mm de longitud (A-M System, Calsborg, EE.UU.) con un diámetro interior de 165 µm, que se introdujo asimismo en la boquilla para gotículas (tal como se representa en la figura 3) de tal modo que el suero se podía mezclar con la salida del citómetro de flujo para formar gotas. Se ajustó el caudal de la bomba para que coincidiera con el caudal del líquido que sale de la línea de clasificación del citómetro. Se incorporó un mezclador en la boquilla introduciendo una tercer agua hipodérmica (diámetro interior de 305 µm, Small Parts Inc.) en la boquilla y, a continuación, introduciendo una aguja hipodérmica más fina (diámetro exterior de 254 µm, Small Parts Inc.) en dicha aguja hipodérmica. Se dobló una aguja hipodérmica fina de 1 mm de longitud en ángulo recto para formar un gancho en la salida de la aguja hipodérmica exterior. Se unió la aguja hipodérmica fina a un motor eléctrico y se giró a aproximadamente 900 rpm.

65

La bomba peristáltica era una unidad independiente con un dispositivo básico de marcación rápida para controlar el inicio de la formación de gotículas, un cilindro neumático de doble efecto de 6 psi con microcalibre (Asco, Frenchs Forest, NSW, Australia), se utilizó con una boquilla de vacío de polipropileno unida. La boquilla de vacío unida al extremo del eje del cilindro se mantuvo en la proximidad del punto de salida de la boquilla para gotículas. La boquilla de vacío garantizó que todos los líquidos procedentes de la boquilla de gota se enviaran a los residuos antes de iniciar la formación de gotículas. En la activación del cilindro de doble efecto, se retiró la boquilla de vacío permitiendo de este modo que se formase directamente una gotícula inmediatamente tras retirar la misma.

El cilindro neumático se controló con un Controlador Lógico Programable (PLC) modelo FC-30 (Festo). El PLC controló asimismo el procedimiento de clasificación del citómetro mediante un ratón modificado Macintosh tal como se describe en el documento WO 01/68902. El funcionamiento normal del procedimiento de clasificación del citómetro se realizó haciendo clic en un ratón. Básicamente, el ratón se modificó para que aceptase una señal de impulso de 24V y una duración de 0,1 s procedente del PLC que imita a un clic del ratón e inicia el procedimiento de clasificación del citómetro.

Se conectó un botón pulsador al PLC. Se conectó un botón pulsador al PLC. Se realizó un programa para el PLC que esperó a que el botón se pulsase e iniciase un ciclo que comprendía las etapas siguientes:

Para preparar una clasificación y la muestra en forma de gotas, se realizaron las etapas siguientes:

- I. activar el procedimiento de clasificación mediante el ratón;
- II. esperar un retardo predefinido suficiente para la primera partícula clasificada a fin de alcanzar el punto de formación de gotículas;
- III. activar el cilindro neumático para retirar la boquilla de vacío fuera del flujo de líquido;
- IV. esperar un retardo predefinido suficiente para permitir que se formase y se separase una sola gota; y
- V. activar el cilindro neumático para desplazar la boquilla de vacío hacia del flujo de líquido;

Clasificar 30 *E. coli* en una sola gota

Preparación de la E. coli

Se cultivó una cepa de *E. coli* (NCTC 9001) a 37 °C durante 24 horas en triptona al 1,6% (p/v) y extracto de levadura 1% (p/v) a un pH de 7,2. Las células se diluyeron hasta 1 en 1000 en PBS filtrado (0,22 µm) y se analizaron inmediatamente.

Análisis de la E. coli

Se definió una zona que contenía la *E. coli* en un gráfico de dispersión donde se representaba la dispersión lateral con respecto a la dispersión frontal. A continuación se utilizó dicha zona para clasificar la *E. coli*.

Selección de la E. coli pretendida

Se ajustó el citómetro según las instrucciones del fabricante para clasificar muestras de 30 células de *E. coli*. Se ajustaron el caudal y la concentración de *E. coli* para garantizar que la velocidad de clasificación se encontrase entre 220 y 250 clasificaciones por segundo. Se recogieron las gotículas en placas nutritivas de agar (Oxoid Ltd), se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos y a continuación se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Tras ello se examinaron las placas de agar y se observó que contenían entre 27 y 30 colonias de *E. coli*.

Congelación y liofilización de las gotículas

Se recogieron las gotículas del citómetro en tubos de ensayo que contenían nitrógeno líquido. Las gotículas se congelaron como esferas o bolas. Tras recoger las gotículas, se dispusieron los tubos en un liofilizador Dynavac FD12 y se secaron durante la noche a un vacío de 2×10^{-1} Torr y una temperatura del condensador de -70 °C.

Al día siguiente, se taparon los frascos al vacío y se retiraron del liofilizador. Se abrieron los frascos y se dispusieron las bolas en placas nutritivas de agar (Oxoid, Australia) y se pipetearon cuidadosamente 200 µl de solución salina estéril al 0,9% en cada bola. Se dejaron rehidratar las bolas durante 5 min y a continuación se dispersaron con un extensor de plástico estéril. Tras la incubación a 37 °C durante 12 horas se examinaron las placas de agar y se observó que contenían entre 25 y 30 colonias de *E. coli*.

Ejemplo 3

Se cultivó la *E. coli*, se analizó y se produjeron gotículas que contenían 30 *E. coli* tal como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Congelación y liofilización de las gotículas

- Se recogieron las gotículas del citómetro en tubos de ensayo que contenían nitrógeno líquido. Tras recoger las gotículas, se dispusieron los tubos en un liofilizador Dynavac FD12 y se secaron durante la noche a un vacío de 2×10^{-1} Torr y una temperatura del condensador de -70 °C. Al día siguiente, se taparon los frascos al vacío y se retiraron del liofilizador. Se abrieron los frascos y se dispusieron las bolas en placas nutritivas de agar (Oxoid, Australia) y se pipetearon cuidadosamente $200 \mu\text{l}$ de solución salina estéril al 0,9% en cada bola. Se dejaron rehidratar las bolas durante 5 min y a continuación se dispersaron con un extensor de plástico estéril. Tras la incubación a 37 °C durante 12 horas se examinaron las placas de agar y se observó que contenían entre 25 y 30 colonias de *E. coli*.
- 5
- 10
- Loa expertos en la materia podrán apreciar que se pueden realizar numerosas variaciones y/o modificaciones a la presente invención tal como se ha presentado en las formas de realización específicas sin apartarse del espíritu o alcance de la presente invención. Las presentes formas de realización se consideran, por lo tanto, en todos los aspectos como ilustrativas y no limitativas.

REIVINDICACIONES

1. Citómetro de flujo configurado para formar una gota que contiene un número predeterminado de dos o más partículas que comprende:
- 5 (a) unos medios (38) para desplazar partículas en una corriente de flujo de líquido (35) procedente de una fuente de líquido (34);
 (b) unos medios detectores o analizadores (46) aptos para detectar o analizar las partículas de la corriente de flujo;
 (c) una ruta de residuos (39) dispuesta aguas abajo de los medios detectores o analizadores para la recepción de residuos líquidos;
- 10 (d) una ruta de recogida (41) dispuesta aguas abajo de los medios detectores o analizadores para la recepción de líquidos de recogida que contienen las partículas pretendidas;
 (e) una boquilla para gotículas (70) que presenta una abertura de salida definida para dispensar una gota de un volumen definido que contiene un número predeterminado de dos o más partículas de la ruta de recogida; y
 (f) unos medios de control (42) para dirigir la corriente de líquido hacia la ruta de residuos o la ruta de recogida.
- 15 2. Citómetro según la reivindicación 1, en el que los medios para desplazar las partículas en una corriente de flujo líquido son una bomba (38).
3. Citómetro según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que los medios detectores o analizadores comprenden:
- 20 (i) unos medios (46A) para proporcionar un haz de luz para iluminar las partículas de la corriente de flujo de líquido;
 (ii) unos medios (46B) para detectar la luz con respecto a cada partícula en movimiento y para asociar la luz detectada a una o más características de cada partícula y generar una señal correspondiente a la característica de la partícula (s); y
 (iii) unos medios para recibir la señal.
- 25 4. Citómetro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la ruta de residuos comprende un tubo de residuos (39) dirigido a un sitio de recogida de residuos (40).
- 30 5. Citómetro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la ruta de recogida comprende un tubo de captura (41) que presenta un volumen definido.
- 35 6. Citómetro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la ruta de recogida comprende un tubo de captura (41) y un tubo de recogida (60) que presenta un volumen definido que pasa desde el tubo de captura.
7. Citómetro según la reivindicación 6, en el que la boquilla para gotículas se puede disponer sustancialmente en un extremo del tubo de captura (41).
- 40 8. Citómetro según la reivindicación 6, en el que la boquilla para gotículas se puede disponer sustancialmente en un extremo del tubo de recogida (60).
9. Citómetro según la reivindicación 8, que comprende además una fuente secundaria de muestras (80) que puede añadir líquido a la boquilla para gotículas.
- 45 10. Citómetro según la reivindicación 9, en el que la fuente secundaria de muestras (80) se añade a la boquilla para gotículas (70) mediante unos medios de bombeo (86).
- 50 11. Citómetro de flujo según la reivindicación 1, configurado para formar una gota que contiene un número predeterminado de dos o más partículas que comprende:
- (a) una fuente de líquido (34) para generar una corriente de líquido que contiene partículas;
 (b) un sistema de detección (46) para detectar una o más propiedades de una partícula contenida en la corriente de líquido;
- 55 (c) un tubo de captura (41) apto para recoger un número predeterminado de partículas y dirigir las partículas hacia una salida en un volumen predeterminado de líquido, presentando el tubo de captura (41) una entrada para recibir selectivamente partículas de la corriente de líquido, pudiendo desplazarse el tubo de captura entre:
- (i) una primera posición en la que las partículas contenidas en la corriente de líquido se reciben en la entrada y se dirigen hacia la salida, y
 (ii) una segunda posición en la que las partículas no se reciben en la entrada;
- 60 (d) un sistema de control (42) para controlar la posición del tubo de captura (41) según las señales recibidas desde el sistema de detección (46) para de este modo provocar la recogida del número predeterminado de partículas;

(e) una boquilla para gotículas (70) que presenta una abertura de salida definida para dispensar una gota que contiene el número predeterminado de dos o más partículas de la ruta de recogida; y (f) un selector para seleccionar las gotas de líquido que se presentan en la salida según las señales recibidas desde el sistema de detección.

5 12. Citómetro según la reivindicación 11 que comprende además un sensor (50) para detectar la salida de cada gota de la salida, siendo asimismo el selector apto para recoger selectivamente las gotas según las señales recibidas del sensor.

10 13. Citómetro según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, que comprende o es apto además para cooperar con, un sistema de procesamiento acoplado al sistema de detección (46), el sistema de control (42), el sensor (50) y el selector, siendo el sistema de procesamiento apto para:

(i) realizar el seguimiento de la salida de una gota de líquido de la salida del tubo de captura (41) utilizando el sensor (50);

15 (ii) provocar que el sistema de control (42) desplace el tubo de captura (41) hasta la primera posición para de este modo dirigir una partícula que presenta las propiedades seleccionadas hacia el tubo de captura (41);

(iii) repetir (ii) hasta que un número predeterminado de partículas se ha dirigido hacia el tubo de captura (41);

(iv) controlar la duración de (ii) y (iii) para garantizar de ese modo que el número predeterminado de partículas se encuentra contenido en una única gota de líquido;

20 (v) realizar el seguimiento de la salida de la gota de líquido de la salida del tubo de captura utilizando el sensor; y

(vi) provocar que el selector seleccione la gota de líquido.

14. Citómetro según las reivindicación 12, en el que el selector comprende:

25 (a) un brazo colector (52);

(b) un controlador para controlar la posición del brazo colector (52), siendo el brazo colector apto para desplazarse entre:

(i) una primera posición en la que las gotas de líquido se recogen mediante el brazo colector (52); y

30 (ii) una segunda posición en la que las gotas de líquido no se recogen mediante el colector.

15. Citómetro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la boquilla para gotículas (70) se puede disponer sustancialmente en un extremo del tubo de captura (41) aguas abajo del detector o analizador (46).

35 16. Citómetro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que puede comprender además unos medios de captura de gotículas que pueden eliminar las gotas formadas por la boquilla para gotículas (70).

17. Citómetro según las reivindicación 16, en el que los medios de captura de las gotículas son una bomba de vacío dispuesta adyacente a la boquilla para gotículas.

40 18. Citómetro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que puede formar una gota que presenta un volumen comprendido entre 1 μl y 500 μl ; preferentemente entre 20 μl y 100 μl ; y más preferentemente de aproximadamente 30 μl .

45 19. Método para obtener una gota de líquido que presenta un número predeterminado de dos o más partículas de un tipo pretendido, comprendiendo el método:

(a) proporcionar un citómetro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18;

(b) proporcionar una muestra que contenga partículas de la corriente de líquido;

50 (c) detectar o analizar las partículas en la corriente de líquido;

(d) dirigir un tipo pretendido de partícula hacia la ruta de recogida en un líquido de recogida;

(e) pasar el líquido de recogida que contiene el tipo pretendido de partículas a través de la boquilla para gotículas; y

(f) recoger el número predeterminado de dos o más partículas de un tipo pretendido en una gota.

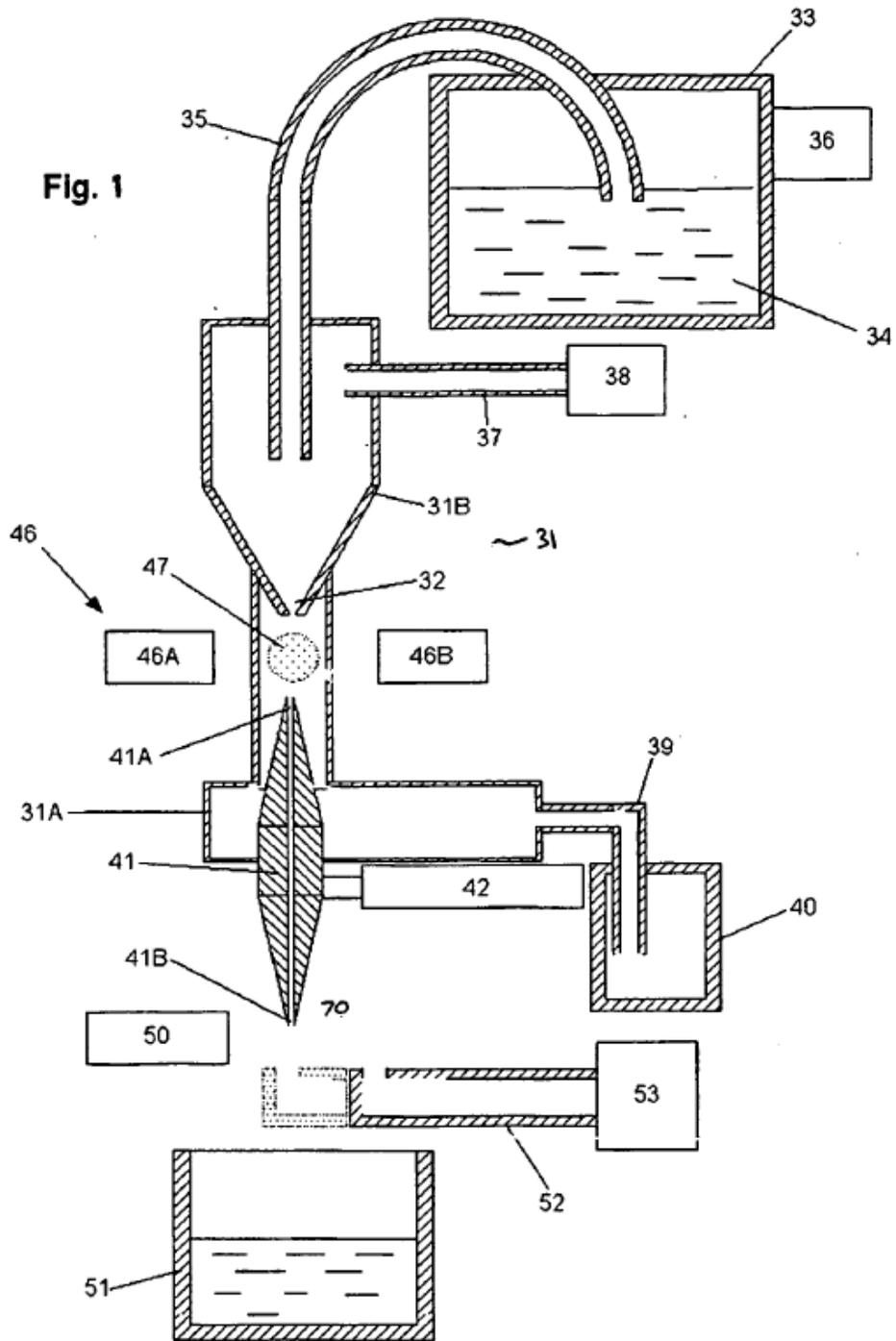


Fig. 2

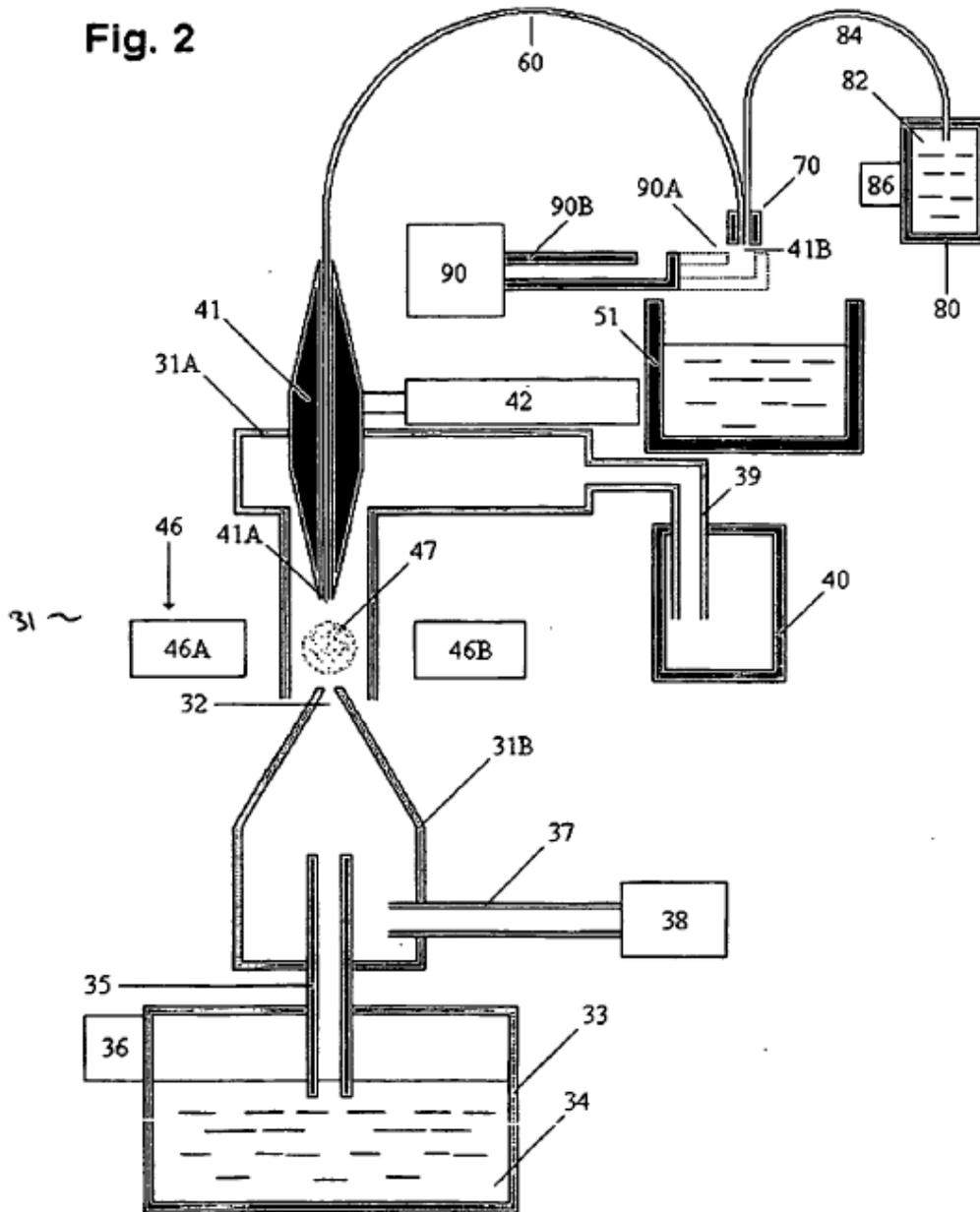


Fig. 3

