

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 520**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2000 E 10001278 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2180307**

54 Título: **Boquilla de citómetro de flujo**

30 Prioridad:

03.12.1999 US 454488

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

03.03.2014

73 Titular/es:

**XY, LLC (100.0%)
22575 STATE HIGHWAY 6 SOUTH
NAVASOTA, TX 77868, US**

72 Inventor/es:

**BUCHANAN, KRISTOPHER S. y
HERICKHOFF, LISA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 445 520 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

Boquilla de citómetro de flujo

5 **I. Campo técnico**

Esta invención se refiere a un sistema mejorado de citómetro de flujo. Específicamente, esta invención se refiere a un diseño novedoso de una geometría de una superficie interior de una boquilla que manipula con cuidado y orienta una muestra en una dirección radial apropiada para un análisis y una clasificación eficaz. La presente invención también se centra en un procedimiento para clasificar células delicadas, especialmente espermatozoides vivos.

10 **II. Antecedentes**

Los citómetros de flujo han tenido un uso clínico y de investigación durante muchos años y sus aplicaciones en la industria animal tal como en la industria de cría de animales han aumentado rápidamente. Un citómetro de flujo disponible comercialmente utiliza normalmente una geometría cilíndrica de fluido en su boquilla. Este tipo de sistema de citómetro de flujo tiene un recorrido de flujo que se centra con una simetría de revolución, como se describe en algunas patentes de los EE.UU. (n.ºs de patente: 5.602.039, 5.483.469, 4.660.971, 4.988.619 y 5.466.572). Este tipo de diseño, según la ley de similitud, no produce muestras orientadas de forma radial. En los campos clínico, de cría de animales y de investigación biológica, cuando se clasifican células tales como espermatozoides, pueden ser pre-teñidas con una tinción que produce fluorescencia cuando se expone a una fuente de luz de excitación. Como se explicó en la patente de los EE.UU. n.º 5.135.759 de Lawrence Johnson, se puede utilizar un citómetro de flujo que detecta la fluorescencia emitida perpendicular al eje de flujo con gran precisión en la medición y en la discriminación del contenido de ADN de las células. Sin embargo, como otros han señalado, incluso esta precisión en la medición del contenido de ADN solo puede conseguirse de forma más eficaz cuando las células de interés son esféricas o cilíndricas (Dean y cols., 1978, *Biophys. J.* 23: 1-5). En cuanto a los espermatozoides -que tienen cabezas planas- la intensidad observada de fluorescencia depende en gran parte de la orientación apropiada de las cabezas con respecto al detector. Los espermatozoides emiten una señal fluorescente más fuerte desde el borde de la superficie plana. Por lo tanto, la intensidad de la señal fluorescente depende de la orientación de la cabeza del espermatozoide según pasa por el detector. Debido a que el contenido de ADN se determina por medio de fluorescencia y debido a que la intensidad fluorescente se ve afectada por la orientación, la determinación del contenido de ADN puede complicarse por la falta de orientación en una boquilla. Por esta razón, sin una orientación radial, la distribución de intensidad de fluorescencia resultante obtenida para cabezas normales de espermatozoide orientadas al azar refleja tanto el contenido de ADN como la orientación de las cabezas. Debido a que las células emiten una señal de fluorescencia más brillante desde el borde de la cabeza (Gledhill y cols., 1976, *J. Cell Physiol.* 87: 367-376; Pinkel y cols., 1982, *Cytometry* 7: 268-273) la precisión de la determinación del contenido de ADN (que puede diferir en tan solo el 3,5 %) se ve muy afectada por la orientación de las células. Por esta razón, el citómetro convencional de flujo ha sufrido limitaciones, especialmente cuando se clasifican espermatozoides aplanados u otras células no esféricas o no cilíndricas y similares.

Además, ciertas células pueden exhibir una funcionalidad reducida como resultado del procedimiento de clasificación. Esto puede ser particularmente cierto para células tales como espermatozoides de mamíferos que no son solo delicados mecánicamente, sino que también se vuelven funcionalmente incapacitados (como quizás se puede ver por de una fertilidad reducida) o incluso heridos mortalmente como resultado de alguna incidencia en el procedimiento de clasificación. Ha habido limitaciones significativas en las tentativas de citometría de flujo con células delicadas acerca de las capacidades. Esto es más grave en el campo altamente especializado de clasificación de espermatozoides no solo porque las propias células son excepcionalmente delicadas, sino también porque existe la necesidad de tasas extremadamente elevadas de clasificación por razones fisiológicas y prácticas. Ha sucedido que estas dos necesidades contrapuestas suponen retos sumamente críticos en el campo excepcional de clasificación de esperma con fines comerciales de cría. Por lo tanto, aunque estos dos aspectos -una manipulación y una orientación con cuidado- son quizás aplicables de forma independiente en una variedad de casos, en muchos casos pueden actuar de forma sinérgica. Tanto sus caracteres como sus interrelaciones sinérgicas son quizás más críticas en el campo comercial de clasificación de esperma. De modo interesante, parece que esta sinergia e interrelación potencial no han sido apreciadas completamente antes de la presente invención.

Vistos por separado, el aspecto de una orientación apropiada de una muestra que contiene partículas o células puede ser vista por lo tanto que desempeña un papel importante en la intensidad y en la calidad de la señal del citómetro de flujo y en la eficacia de clasificación. Se han realizado esfuerzos para orientar la muestra de forma hidrodinámica y se ha explorado en las últimas décadas el uso de la orientación hidrodinámica de la muestra en flujo a través de sistemas y citómetros de flujo (Fulwyler, 1977, *J. Histochem. Cytochem.* 25: 781-783; Kachel y cols., 1977, *J. Histochem. Cytochem.* 25: 774-780; Dean y cols., supra). La orientación hidrodinámica de la muestra dentro del citómetro de flujo puede mejorar la medición precisa del contenido relativo de tinción del ADN y también puede proporcionar una medición potencialmente útil de parámetros morfológicos tales como grosor de las células y grado de curvatura de la cara plana. Para algunas aplicaciones, esta orientación es sencilla. No obstante, cuando hay implicadas células delicadas (tal como espermatozoides) u otras partículas, ha sido necesaria, sin embargo, una técnica más cuidadosa. Por ejemplo, incluso se ha utilizado un tubo de inyección de muestras con una punta con forma de cuña en algunos

intentos por aumentar el porcentaje de las células orientadas (Dean y cols., 1978, *Biophys. J.* 23: 1-5; Fulwyler, 1977, *J. Histochem. Cytochem.* 25: 781-783; Johnson y cols., 1986, *Cytometry* 7: 268-273; Pinkel y cols., 1982, *Cytometry* 3: 1-9; Welch y cols., 1994, *Cytometry* 17 (supl. 7): 74). Debido a esta punta con forma de cuña del tubo de inyección de muestras, la corriente de muestras tendía a ser aspirada en una banda delgada por el fluido envolvente a diferencia de lo que ocurre en una corriente cilíndrica. Las células con cabezas planas tal como espermatozoides de mamíferos, encontraron a menudo el fluido envolvente a una mayor velocidad (100 mm/seg) y fueron giradas de forma que sus lados planos se encontraban en el plano de la banda. Por desgracia, la separación del evento de orientación y el evento de análisis final pueden provocar resultados que no llegan a ser óptimos. Por lo tanto, esta técnica no ha mostrado ser prácticamente tan ventajosa como se desea.

En una aplicación distinta, Kachel y sus colegas (Kachel y cols., supra) demostraron la ley de similitud y expusieron tres tipos de recorridos de flujo que influyen en las partículas en movimiento. Concluyeron que, para conseguir una orientación radial uniforme con fuerzas hidrodinámicas para partículas planas tales como hematíes aplanados, el recorrido preferido de flujo sería aquel en mediante que se obtuviese una constricción unilateral. El recorrido de flujo más sencillo que exhibe una constricción unilateral incrementada en uso con un sistema de flujo a través del mismo se haría de un tubo con un corte transversal elipsoidal y también terminaría en una salida elipsoidal. En una disposición, el eje largo de esta salida elipsoidal estaría ubicado en un ángulo recto con el eje largo en el corte transversal del tubo elíptico de constricción. Sin embargo, dado que la salida elíptica no produce el tipo de gotitas deseado para un citómetro de flujo de alta velocidad clasificador de células, no está previsto que esta disposición se utilice en un citómetro de flujo y aparentemente no se ha aplicado a uno.

En un intento similar, Rens y sus colegas diseñaron una punta de boquilla que tenía un interior elíptico y un orificio elíptico de salida (Rens y cols., 1998, Publicación PCT n.º: PCT/US98/15403; Rens y cols., 1998, *Cytometry* 33: 476-481; Rens y cols., 1999, *Mol. Reprod. Dev.* 52: 50-56). Este interior contenía una primera zona elipsoidal y una segunda zona elipsoidal que estaban separadas por una zona de transición. Todas las zonas tenían cada una un eje largo y un eje corto. El eje largo de la segunda zona elipsoidal estaba orientado 90° respecto al de la primera zona elipsoidal. Había un orificio cilíndrico, taladrado a través de una piedra preciosa, ubicado en el extremo del orificio elipsoidal de salida y servía como la salida final. Este dispositivo solucionó parcialmente el problema de la orientación aleatoria como la que existía en un citómetro de flujo convencional y podía orientar aproximadamente el 60 % del total de los espermatozoides aplanados de un cerdo cada vez a través del citómetro de flujo. No obstante, cuando se toman en consideración las fuerzas hidrodinámicas en un recorrido de flujo, las partículas planas que pasan a través de la boquilla diseñada por Rens y sus colegas han recibido tensiones innecesarias. Para células delicadas y especialmente para los espermatozoides quizás más delicados tales como los espermatozoides equinos o bovinos este enfoque simplemente, no parece que produzca la eficacia deseada ni en la orientación ni en la viabilidad celular.

El documento WO 99/05504 A divulga una boquilla de citómetro de flujo para una clasificación de células altamente eficiente.

El documento EP 0288029 versa acerca de un dispositivo de flujo de células de tipo flujo envolvente adecuado para su uso en un análisis celular de cuerpos vivos.

Johnson y cols., 1999, *Theriogenology* 52, 1323-1341, hace referencia a un procedimiento citométrico de flujo de alta velocidad de clasificación de espermatozoides X e Y y acerca de cómo se puede maximizar la eficacia de dicho procedimiento.

Kachel y cols., 1977, vol. 25, páginas 774-780 se refiere al uso de orientación hidrodinámica de la muestra en flujo a través de sistemas y analiza tres tipos de recorridos de flujo que influyen a las partículas que se mueven.

Sin embargo, ninguno de los documentos de la técnica anterior se refiere al diseño de boquilla específico como se reivindica en la reivindicación 1.

De este modo, existía una necesidad percibida desde hace tiempo, pero no satisfecha, de la invención, aunque las técnicas y los elementos de aplicación necesarios habían estado disponibles desde hace mucho. Esta necesidad tenía que ver con la capacidad para manipular con cuidado y quizás orientar las partículas o las células que van a ser analizadas, la capacidad para analizar de forma apropiada y clasificar de forma eficaz y la capacidad para minimizar la situación potencialmente estresante que el citómetro de flujo provoca para las partículas o células. Además, aunque existían problemas en los citómetros de flujo convencionales, una comprensión completa de que existía un problema y qué el problema resultaba invisible hasta entonces para los expertos en la técnica. Se habían llevado a cabo intentos sustanciales por los expertos en la técnica para cubrir la necesidad o para afrontar las dificultades pero no habían tenido un éxito completo lo más probablemente debido a un fracaso para comprender cuáles eran exactamente los problemas y quizás cómo se interrelacionaban. Algunos esfuerzos realizados por los expertos en la técnica incluso se desarrollaron en patentes que parecía que habían hecho referencia a los problemas pero, de hecho, tendían en algunos aspectos a enseñar algo que se aleja de la dirección técnica en la que fueron los autores de la presente invención.

III. Divulgación de la invención

Por lo tanto, es un objetivo presentar un sistema de citómetro de flujo que comprende una geometría mejorada de la superficie interior de una boquilla que produce el recorrido más sencillo de flujo para aplicar fuerzas hidrodinámicas necesarias para acelerar y quizás orientar una muestra en una dirección apropiada con fines de análisis y de clasificación eficaz. Esta geometría mejorada de la superficie interior de una boquilla comprende un elemento de una sola superficie interior torsional, elipsoidal, dentro de una boquilla de una sola orientación torsional que produce las fuerzas hidrodinámicas especiales, concretamente fuerzas de una sola orientación torsional.

Como muestra ahora la presente invención, los problemas con tensión celular no deseable podían ser vistos, al menos en parte debidos bien a fuerzas no apropiadas de manipulación, específicamente: fuerzas no apropiadas de aceleración, o bien a la existencia de una segunda fuerza torsional creada por la segunda zona elipsoidal. En cuanto a las fuerzas aplicadas de aceleración, los dispositivos utilizaron a menudo transiciones bruscas internas en la boquilla y provocaron de esta manera una aceleración extrema durante distancias cortas. En cuanto al aspecto de la orientación, por ejemplo, enfoques tales como el de Ren (mencionado anteriormente) mostraron, que después de que se orientaron las células por medio de una primera fuerza torsional creada por una primera zona elipsoidal, se aplicó una tensión adicional -quizás duplicándola-. Específicamente, las partículas planas ya se encontraban en una posición orientada después de que se orientaron desde una posición aleatoria por la primera zona elipsoidal. Estaban listas para salir en posiciones orientadas. Sin embargo, en este momento, los dispositivos de Rens y otros retorcián sin necesidad estas partículas planas orientadas una segunda vez por medio de las fuerzas hidrodinámicas creadas por una segunda zona elipsoidal. Como muestra la presente invención, estos diseños no son del todo eficaces en un citómetro de flujo de alta velocidad. Cuando se orientan los espermatozoides planos con colas a través de este tipo de boquilla, aparte de su ineficacia, la geometría en este tipo de boquilla aparentemente impacta dos veces en las fuerzas torsional. Esto parece que provoca mucha tensión innecesariamente o que daña los espermatozoides de cola larga antes de que salgan de la boquilla. Además, en algunos diseños en los que el orificio está fabricado en una piedra preciosa que está separada del interior principal, también puede verse afectado en algún grado un flujo laminar homogéneo. Esto podría provocar una aceleración casi instantánea y por lo tanto podría fatigar sin necesidad a las células y podría afectar a la orientación de los espermatozoides ya orientados. Por lo tanto, los enfoques de Rens y otras tentativas más recientes realmente enseñan algo que se aleja de la superficie interior laminar homogénea más eficaz, menos aceleratriz y menos torsional de la presente invención.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema que puede medir y clasificar de manera más rápida y precisa la muestra, especialmente espermatozoides delicados en investigación y uso clínico y en la industria de la inseminación animal.

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

La Figura 1 es una vista en corte transversal de una porción de un citómetro de flujo que muestra un recipiente de fluido envolvente, un tubo de inyección de muestras y una boquilla de la presente invención. Esta figura también muestra una ubicación relativa del tubo de muestras dentro de la boquilla.

La Figura 2 es una vista tridimensional de una punta de la boquilla y su posición relativa con el recipiente de fluido envolvente (el cuerpo de la boquilla aquí) con un tubo de inyección de muestras y una punta de boquilla. La Figura 2A es un dibujo esquemático del tubo de inyección de muestras que tiene una punta biselada y una boca circular.

Las Figuras 3A, 3B y 3C son dibujos esquemáticos de una de las presentes realizaciones de la boquilla. La Figura 3A es una vista tridimensional de la punta de la boquilla que muestra la primera zona de elipticidad creciente, la ubicación de demarcación de elipse deseada, la zona de elipticidad decreciente, la zona cónica, la zona cilíndrica y el orificio circular de salida. La Figura 3B es una vista esquemática en corte transversal que muestra la superficie interior ahusada de la boquilla en un diseño unitario. La Figura 3C es una vista en corte transversal de la zona cilíndrica y del orificio circular de salida.

La Figura 4A es una vista desde abajo de la región de la punta de la boquilla que muestra específicamente el orificio circular de salida. La Figura 4B es una vista desde arriba del diseño interior de la boquilla que muestra la boca circular más grande, la ubicación de demarcación de elipse deseada, la boca circular más grande de la zona cónica y la boca circular más pequeña de la zona cilíndrica. El diámetro de la boca más pequeña es también el del orificio circular de salida.

La Figura 5 muestra cómo funciona la boquilla de una sola orientación torsional para orientar partículas planas.

La Figura 6 es un diagrama esquemático de un ejemplo de una boquilla que tiene superficies de movimiento axial como pueden haber existido en la técnica anterior.

Las Figuras 7a, 7b y 7c son gráficos de la velocidad, la aceleración y la tasa de cambio de movimientos de aceleración axiales teóricas con respecto a la ubicación como las que pueden existir para una boquilla, tal como la mostrada de forma esquemática en la Figura 6.

La Figura 8 es un diagrama esquemático de un ejemplo de una boquilla que tiene superficies de movimiento axial según una realización de la presente invención.

5 Las Figuras 9a, 9b y 9c son gráficos de la velocidad, aceleración y tasa de cambio de movimientos de aceleración axiales teóricas con respecto a la ubicación como las que pueden existir para una boquilla tal como la mostrada de forma esquemática en la Figura 8.

V. Modos para llevar a cabo la invención

10 Se podría conseguir el objetivo de la presente invención por el sistema de citómetro de flujo según la reivindicación 1.

Como puede verse a partir de las ilustraciones y en consonancia con el objetivo de la presente invención, se pueden implementar los conceptos básicos de la presente invención de distintas formas. Con referencia a la Figura 1, muestra una porción de un sistema de citómetro de flujo donde se procesa una muestra en gotitas individuales antes de ser
15 analizadas y clasificadas. Como comprenderán bien las personas con un nivel normal de dominio de la técnica, a partir de la vista esquemática en corte transversal, un recipiente de fluido envolvente (1) puede contener algo de fluido envolvente (2) importado a través de la vía de acceso de fluido envolvente (no mostrada). Un sistema de inyección de muestras comprende un tubo de inyección de muestras (3) conectado a un depósito de muestras (no mostrado). En general, el sistema de inyección de muestras actúa para proporcionar el flujo apropiado de algo del material de la
20 muestra a un sistema de boquilla. Al mismo tiempo, el recipiente de fluido envolvente introduce un fluido envolvente dentro del sistema de boquilla. La muestra puede estar rodeada por el fluido envolvente para formar un fluido que contiene una muestra y puede luego salir del sistema de boquilla a través de un mecanismo de formación de gotas a través del que el fluido que contiene una muestra forma gotitas pequeñas. Estas gotitas pequeñas pueden pasar a través de un área de caída libre a una velocidad elevada de más de 20 metros por segundo por medio de la
25 combinación de la oscilación por medio de un oscilador y una presión elevada del sistema de citómetro de flujo. Subsiguientemente, se pueden analizar estas gotitas pequeñas, es decir, las gotas que contienen la muestra, por medio de un sistema analítico (no mostrado) en el área de caída libre. Si se introducen células vivas tales como espermatozoides planos como el material de la muestra, pueden ser teñidas con uno o más tintes fluorescentes. Estos espermatozoides pueden transportarse en una sola hilera en la corriente de fluido envolvente por el sistema analítico (no mostrado). El sistema analítico puede incluir un láser enfocado cuya longitud de onda se ajusta para excitar un tinte
30 fluorescente que puede estar presente. Entonces, se puede detectar la señal de fluorescencia recogida de cada célula por medio de un sistema (no mostrado) de detección. Entonces, este procedimiento puede incluir un procedimiento de clasificación por medio de un dispositivo de clasificación o similar, dependiendo de la propiedad física concreta tal como el contenido de ADN de cada célula introducida, mediante la aplicación diferencial de carga a las diversas gotitas como comprenderán fácilmente los expertos en la técnica. Subsiguientemente, se clasifica cada célula dependiendo
35 de su carga. Como se ha mencionado anteriormente, estos aspectos generales de la citometría de flujo se conocen bien y están expuestos en las referencias mencionadas anteriormente.

En relación con la manipulación de la muestra para las funciones del citómetro de flujo y la viabilidad de la muestra, dos
40 aspectos pueden ser importantes: la alineación torsional y el movimiento axial de la muestra. Se expone cada uno de estos por separado, sin embargo, se debería comprender que no son mutuamente exclusivos y pueden tener efectos de forma sinérgica. Esto es especialmente cierto en relación con la viabilidad de la muestra, es decir, la capacidad de la muestra para llevar a cabo sus funciones con eficacias esperadas y que no se vea sustancialmente afectada por el procesamiento de la citometría de flujo. Se expone en primer lugar el primero de estos dos aspectos, la alineación
45 torsional.

Los aspectos ilustrados en la Figura 1 también pueden verse en la vista tridimensional mostrada en la Figura 2. Esta
50 vista tridimensional muestra una porción del recipiente de flujo envolvente (1), el tubo de inyección de muestras (3) y el sistema de boquilla que tiene una boquilla (6). El tubo de inyección de muestras (3), como se muestra en la Figura 2A en detalle, tiene una punta biselada (4) y una boca circular (5). La boquilla especialmente diseñada (6) se denomina boquilla de una sola orientación torsional en la presente invención y será presentada en detalle a continuación.

Como se conoce, el tubo de inyección de muestras sirve para introducir el material de muestra en un flujo delgado dentro del sistema de boquilla donde la muestra está rodeada por el fluido envolvente. Como se conoce bien por las
55 personas con un nivel normal de dominio de la técnica, el tubo convencional de inyección de muestras tiene a menudo una forma cilíndrica. Sin embargo, dado que este tipo de tubo de inyección de muestras puede no ayudar a controlar la orientación de la muestra, la muestra que sale de este tipo de tubo de inyección de muestras tiene normalmente un estado no orientado. En las últimas dos décadas, se produjo un tubo de inyección de muestras modificado (Dean y cols., 1978, supra; Fulwyler, 1977, supra; Johnson y cols., 1986, Cytometry 7: 268-273; Pinkel y cols., 1982, supra). Este tubo de inyección de muestras modificado puede tener una punta biselada y puede ayudar, hasta cierto punto, en
60 orientar el material de muestra que sale de su punta. Debido a la forma biselada en la punta del tubo de inyección de muestras, se puede aspirar la corriente de muestra en una banda delgada por medio del fluido envolvente. El cambio resultante en la condición del flujo puede provocar una orientación correspondiente del material de muestra.

65 En el presente diseño, basado en el concepto del mecanismo de la punta biselada, se mantiene el tubo de inyección de muestras con el tipo de punta biselada mostrado pero el tamaño interior específico es único. Lo más importante, está

especialmente fijada la ubicación de la punta biselada dentro de la boquilla. Como se muestra en la Figura 2A, el tubo (3) de inyección de muestras, denominado aquí un tubo de inyección de muestras de mejora de la orientación, comprende una punta biselada (4) y una boca circular (5) en su corte transversal. La punta biselada es más o menos una forma rectangular en su corte transversal. Esta tiene un eje largo y un eje corto. Aunque naturalmente esto se puede variar para adecuarse a la aplicación o a las partículas que estén siendo clasificadas, en una realización preferida el ángulo de la punta biselada es de aproximadamente 4° , el diámetro externo del tubo es de aproximadamente 1,5 mm y el diámetro de la boca circular es de aproximadamente 0,25 mm.

Hasta aquí, los autores de la invención solo han expuesto el papel que desempeña un tubo de inyección de muestras en orientar la muestra. Sin embargo, se puede comprender que como comprenderán los expertos en la técnica, las fuerzas de orientación proporcionadas de esta forma están muy limitadas. Por ejemplo, si esta característica por sí sola hubiese solucionado los problemas de orientación, las tentativas a partir de entonces para una orientación de un porcentaje elevado no hubiesen sido necesarias. En cambio, como se darán cuenta los expertos en la técnica, para obtener una muestra altamente orientada, especialmente cuando la muestra contiene células planas, no esféricas o delicadas tales como espermatozoides para un fin de inseminación o similar, es necesario un enfoque adicional. Como muestra la presente invención, la mayoría de las fuerzas de orientación deberían provenir de la superficie interior de la boquilla. Por lo tanto, la boquilla sirve como elemento fundamental para la producción de fuerzas de orientación funcionales y debidamente potentes y, pese a ello, suaves.

Entendiendo esto, se puede ver ahora cómo difiere el presente diseño con respecto a la técnica anterior. Como puede verse de forma óptima en las Figuras 1 y 2 y como se destaca en particular en las Figuras 3A, 3B y 3C, el sistema de citómetro de flujo comprende la boquilla de una sola orientación torsional diseñada de forma única (6). La boquilla de una sola orientación torsional (6) puede estar fabricada de algunos materiales selectivos tales como un material cerámico y similares. Aunque puede variar el tamaño de la boquilla, por ejemplo, la altura y el diámetro, etc., preferentemente debe caber dentro de un citómetro de flujo convencional y al mismo tiempo proporcionar las fuerzas deseadas de orientación como se describe en la presente invención. Además, aunque en una realización preferida la boquilla está fabricada de una sola pieza, en aras de una mejor ilustración, puede estar dividida en dos porciones, es decir, una porción cilíndrica superior (a) y una porción cónica inferior (b). En una de las realizaciones preferidas, la altura de la porción cilíndrica superior (a) puede ser de aproximadamente 8 mm y el diámetro externo puede ser de aproximadamente 6 mm. La altura de la porción cónica (b) puede ser de aproximadamente 4,5 mm y el diámetro externo en el orificio puede ser inferior a aproximadamente 1 mm. Por lo tanto, la altura total de la boquilla puede ser de aproximadamente 12,5 mm. El uso de una boquilla unitaria también ayuda a fijar todos los factores de orientación y de movimiento axial en una disposición óptima. Por lo tanto, también puede aumentar de este modo la facilidad de uso, la repetibilidad y otras cuestiones prácticas.

La Figura 3A es una vista tridimensional y las Figuras 3B y 3C son vistas esquemáticas en corte transversal de una boquilla de una sola orientación torsional de la presente invención. Como se puede ilustrar mejor en las Figuras 3A y 3B, la boquilla de una sola orientación torsional (6) comprende un volumen de boquilla rodeado por un elemento de superficie interior. El elemento de superficie interior de la boquilla de una sola orientación torsional constituye su geometría interior. El elemento de superficie interior comprende un elemento de una sola superficie interior torsional que tiene una única superficie interior torsional. Este elemento de una sola superficie interior torsional tiene la capacidad de generar fuerzas hidrodinámicas torsionales únicas que tienen un eje hidrodinámico cuando un flujo que contiene la muestra pasa a través del mismo. El elemento de una sola superficie interior torsional también tiene una característica de aceleración de la velocidad que puede producir una velocidad acelerante sobre la muestra. Cuando la muestra pasa a través de este elemento de una sola superficie interior torsional, se orienta la muestra por medio de las fuerzas hidrodinámicas torsionales únicas y se alinea de forma radial con respecto al eje hidrodinámico. También se puede acelerar para que salga para el análisis y el procedimiento de clasificación subsiguientes. Estas fuerzas hidrodinámicas torsionales únicas pueden ser denominadas fuerzas de una sola orientación torsional.

La forma global de la única superficie interior torsional está ahusada gradualmente corriente abajo, de forma que puede denominarse como un elemento de una sola superficie interior torsional, ahusado gradualmente. Desde la vista de sección longitudinal como se muestra en la Fig. 3B, este elemento de una sola superficie interior torsional, ahusado gradualmente puede ser visto en dos dimensiones con una forma "similar a un abanico" que se abre desde la parte inferior hasta la parte superior. El grado de ahusamiento del elemento de una sola superficie interior torsional, ahusado gradualmente puede variar pero preferentemente puede ser de aproximadamente 23° desde la parte inferior de la forma "similar a un abanico" hasta la parte superior, de forma que se puede generar la fuerza deseada de aceleración para actuar sobre la muestra. Además, el elemento de una sola superficie interior torsional, ahusado gradualmente puede estar dividido en algunas zonas en base a su geometría interior y cada zona puede tener una superficie de flujo laminar. Básicamente, el elemento de una sola superficie interior torsional, ahusado gradualmente, está fabricado de una zona interior (c) de forma similar a una elipse, ahusada, que tiene una única superficie interior torsional, de forma similar a una elipse, y una zona interior cilíndrica (d) en la vista tridimensional. Esta única superficie interior torsional, similar a una elipse puede incluir distintas formas en sus cortes transversales. Por ejemplo, además de ser de forma de elipse, puede ser de forma oval, o incluso de una forma cercana a la rectangular. Cualquiera de estas formas puede darse en cualquier ubicación a lo largo de la única superficie interior torsional, similar a una elipse justo encima y debajo de una ubicación de demarcación en la que su elipticidad, ovalidad o incluso rectangularidad alcanza un grado máximo o deseado. Como se debería comprender, se pretende que cada una de estas formas esté abarcada por la

expresión "similar a una elipse" aunque no esté presente una elipse matemática verdadera en un corte transversal dado.

5 Por supuesto, la zona interior ahusada similar a una elipse puede tener un eje mayor y un eje menor en sus cortes transversales y la elipticidad puede estar controlada de forma homogénea. Por lo tanto, dependiendo de su variación de elipticidad, esta zona interior ahusada similar a una elipse puede estar dividida en las siguientes zonas desde la parte superior corriente abajo hasta la parte inferior:

10 1) una zona de elipticidad creciente (8) con una boca circular (7) en la parte superior en la que está aumentando la relación del eje mayor con respecto al eje menor en los cortes transversales;

15 2) una ubicación de demarcación de elipse deseada (9) corriente abajo de la zona de elipticidad creciente (8) en la que la relación del eje mayor con respecto al eje menor alcanza una relación óptima que puede ser una relación máxima para una muestra, como mejor se ilustra en la Figura 3A; y

3) una zona (10) de elipticidad decreciente en la que la relación del eje mayor con respecto al eje menor en las secciones transversales está decreciendo.

20 En base a la geometría descrita anteriormente, las formas bidimensionales de la vista de corte transversal desde la parte superior hasta la parte inferior de la zona interior similar a una elipse, ahusada pueden experimentar cambios de transición desde un círculo en la región de la boca, a formas similares a una elipse (que pueden incluso ser elipses reales) con una elipticidad creciente gradualmente (que es la relación entre los ejes mayor y menor -con independencia de la forma implicada), a la elipse deseada o similar, a formas similares a una elipse con una elipticidad decreciente gradualmente y finalmente a un círculo de nuevo en la región en la que la zona interior similar a una elipse

25 ahusada se une a la zona cilíndrica. Dado que toda la zona interior similar a una elipse está ahusada, las áreas de corte transversal de toda la zona interior similar a una elipse se volverán gradualmente más pequeñas desde la parte superior a la parte inferior. Por lo tanto, se puede ajustar la elipticidad cambiando la relación entre los ejes mayor y menor. La relación entre los ejes mayor y menor puede cambiar gradualmente desde la parte superior de 1 a más de 1, o quizás incluso una relación óptima para la muestra. La relación óptima puede ser una relación máxima.

30 Subsiguientemente, la relación puede cambiar de nuevo gradualmente desde la relación máxima a una relación menor que la máxima y luego a 1. Como pueden saber bien los expertos en la técnica, cuando la relación llega a ser 1 la forma en corte transversal puede ser un círculo. La relación máxima como se ha hecho referencia anteriormente puede variar hasta cierto grado. En una realización preferida, la longitud del eje mayor puede ser de 2,2 mm y la del eje menor puede ser de 1,0 mm. Por lo tanto, la relación máxima está diseñada para que sea de aproximadamente 2,2 para esta

35 realización preferida. Naturalmente, puede variar en base a la aplicación o similar.

En una realización, la ubicación de demarcación de elipse deseada (9) corriente abajo de la zona de elipticidad creciente (8) dentro de la boquilla puede ser el lugar donde está ubicada la punta biselada del tubo de inyección de muestras. Este también puede ser el lugar donde la muestra en la banda de flujo recibe las fuerzas deseadas de

40 orientación que son completamente funcionales, donde la muestra está sometida mínimamente a un par por medio de las fuerzas deseadas de orientación o las fuerzas de par, donde el tiempo requerido para que la célula salga es mínimo, o donde después de que sale la muestra del orificio de la boquilla puede seguir manteniendo bien su estado orientado de forma que el análisis y la clasificación subsiguientemente pueden llevarse a cabo de forma eficaz. Esta ubicación puede denominarse como un punto de inyección. Para el citómetro de flujo de clasificación de alta velocidad

45 del estado de la técnica actual operado ahora, esta ubicación o el punto de inyección, en base a los descubrimientos de la presente invención, puede ser de aproximadamente 6 mm desde el orificio de salida. Por lo tanto, si una distancia de mantenimiento de la orientación está definida como la distancia que indica lo lejos que una partícula de muestra puede mantener su estado orientado desde el punto en el que está orientada hasta un punto en el que pierde estadísticamente su grado de estado orientado, la distancia desde la punta biselada del tubo de inyección de muestras

50 hasta el orificio de salida de la boquilla y la distancia desde el orificio de salida hasta la intersección con el haz láser o el sensor a lo largo del recorrido de flujo en la zona de caída cae perfectamente dentro de esta distancia de mantenimiento de la orientación. Por ejemplo, puede haber 10 mm o menos desde la punta biselada hasta la intersección con el haz láser, como describieron Dean y sus colegas (Dean y cols., supra). Por lo tanto, cualesquiera partículas de muestra que estén orientadas, sin importar en qué punto dentro de la distancia desde la punta biselada

55 hasta la intersección con el haz láser o el sensor, mantendrán su estado orientado antes de analizarse. En teoría, esta distancia de mantenimiento de la orientación podría incluso ser mayor de 10 mm cuando un citómetro de flujo está equipado con la boquilla diseñada especialmente de la presente invención y el tubo de inyección de muestras con la punta biselada. Además, para todos los beneficios de la orientación, el eje largo de la punta biselada puede estar alineado con el eje mayor de la ubicación deseada de demarcación de la elipse y el eje corto estar con el eje menor,

60 como se muestra.

Corriente abajo desde la zona interior similar a una elipse, ahusada (c) es una zona interior cilíndrica (d). Esta zona interior cilíndrica (d), como puede verse en las Figuras 3A, 3B y 3C puede estar dividida además en una zona cónica (12) que está ahusada y en una zona cilíndrica (14). La zona cónica (12) tiene una boca circular más grande (11) en la

65 parte superior que se une con la zona interior ahusada similar a una elipse (c) y tiene un orificio circular más pequeño (13) en conexión con la zona cilíndrica (14). La boca circular más grande (11) en la parte superior de la zona cónica

puede tener un diámetro de aproximadamente 0,19 mm y la abertura circular puede ser de aproximadamente 0,07 mm en una realización preferida. La altura de la zona cónica puede ser de aproximadamente 0,3 mm. La zona cilíndrica (14) también puede tener una boca con el mismo diámetro que la abertura menor de la zona cónica en todo su orificio circular (15) de salida y puede ser de aproximadamente 0,15 mm de altura.

5 La Figura 4A ilustra una vista desde abajo de la boquilla de una sola orientación torsional que muestra el orificio circular. El orificio circular debería ser lo suficientemente pequeño como para que se formen las gotitas minúsculas que contienen partículas de la muestra. El diámetro en una de las realizaciones preferidas puede ser de aproximadamente 0,07 mm. La Figura 4B muestra una vista desde arriba de la boquilla de una sola orientación torsional. Como puede verse claramente, la boca puede tener una forma circular con un diámetro de aproximadamente 5,25 mm.

10 Con referencia a la Figura 5, puede verse cómo se produce la orientación. Como puede observarse, esta figura es un dibujo modificado de Kachel y sus colegas (Figura 3, Kachel y cols., 1977, J. Histochem. Cytochem. 25: 774-780). Este dibujo, un corte transversal en torno a la ubicación deseada (9) de demarcación de la elipse, muestra, en primer lugar, las distribuciones de las fuerzas de orientación generadas desde la única superficie interior torsional, similar a una elipse. Como se muestra, la transformación distinta de la única superficie interior torsional, similar a una elipse puede hacer que fuerzas laterales preferidas generen componentes adicionales de flujo a lo largo del eje mayor y puede reducir las fuerzas generadas a lo largo del eje menor. Por lo tanto, las fuerzas generadas a lo largo del eje mayor pueden ser vistas como más fuertes que las fuerzas generadas a lo largo del eje menor para orientar de esta manera una partícula plana (16) como se muestra. El diseño único de la presente invención muestra su superioridad en el sentido de que la zona interior similar a una elipse ahusada (c) está conectada directamente a la zona interior cilíndrica (d) y al orificio circular de salida (15). Esta geometría diseñada especialmente evita con éxito la ley de similitud y, por lo tanto, las partículas de la muestra que han sido orientadas podrán salir de forma individual del orificio circular de salida y mantendrán aún su estado alineado de forma orientada.

25 Además de lo anterior, se puede ver que todo el elemento de una sola superficie interior torsional, ahusado comprende una superficie de flujo laminar. Por medio de un flujo laminar y de las fuerzas de una sola orientación torsional generadas por la superficie de flujo laminar, se puede orientar de forma radial y alinear la muestra a lo largo del eje hidrodinámico. La muestra alineada de forma orientada se mantiene de esta manera en el estado alineado de forma orientada cuando sale del orificio circular de salida donde se separa la muestra en partículas concretas y similares, se rodea por una gota de fluido envolvente y se analiza. Por lo tanto, la muestra finalmente orientada puede deberse a los esfuerzos combinados de la punta biselada del tubo de inyección de muestras y de la superficie interior de una sola orientación torsional que, debido a la geometría única, generan fuerzas de una sola orientación torsional y producen flujo laminar.

30 Se debe señalar que toda la superficie interior de la boquilla de una sola orientación torsional puede ser unitaria. La forma de dividir toda la superficie interior en la zona interior similar a una elipse, ahusada (c), la zona interior cilíndrica (d) y sus propias zonas subsiguientes como se han descrito anteriormente es meramente en aras de una explicación clara.

40 La industria de cría de animales ha estado aprovechando cada vez más los principios de la citometría de flujo y utilizando los beneficios que puede proporcionar un citómetro de flujo de alta velocidad. Ahora se pueden discriminar con éxito los especímenes sexados de esperma por medio de los mecanismos de clasificación que emplea el citómetro de flujo. Con esta boquilla de una sola orientación torsional de diseño único, se pueden clasificar los espermatozoides que tienen cromosomas X e Y de forma más eficaz y con un mayor porcentaje, como se ha descrito anteriormente. Los espermatozoides sexados pueden someterse a tampón en el tampón de los autores de la invención compatible con esperma preparado especialmente como se describe en la publicación PCT n.º: WO 99/05504 (LoDo PCT). Los espermatozoides sometidos a tampón pueden inyectarse en la ubicación de demarcación dentro del elemento de una sola superficie interior torsional, similar a una elipse de la boquilla de una sola orientación torsional donde pueden rodearse por el fluido envolvente para formar un esperma rodeado por fluido envolvente. Subsiguientemente, se pueden producir las gotas que contienen esperma por medio de un mecanismo de formación de gotas y analizarse en el área de caída libre. Entonces se cargan las gotas que contienen esperma y se clasifican por medio del dispositivo de clasificación y se recogen por un sistema de recogida compatible con esperma que contiene un fluido de recogida de esperma fabricado especialmente. Este procedimiento completo puede minimizar las tensiones sobre el esperma creadas por medio del procedimiento de clasificación. Entonces, se puede utilizar el esperma que tiene el cromosoma X o Y para la inseminación y la producción de un mamífero de un género deseado.

50 Por lo tanto, es al menos el diseño único de una geometría de la superficie interior de la boquilla de una sola orientación torsional lo que hace que la invención sea superior a otras boquillas convencionales. Como se esperará por las personas con un nivel normal de dominio de la técnica, esta boquilla de una sola orientación torsional, cuando se combina especialmente con el tubo biselado de inyección de muestras ubicado en una ubicación apropiada con respecto a una región específica de la superficie interior de la boquilla de una sola orientación torsional, puede proporcionar resultados que pueden ser aún más satisfactorios.

65 Como se ha mencionado anteriormente, lo anterior ha expuesto el aspecto de alineamiento torsional de la invención. Un segundo aspecto importante es el del movimiento axial de la muestra. Este aspecto abarca no solo el movimiento

de la muestra según atraviesa la boquilla hacia abajo por el eje central, sino también las tensiones que recibe la muestra durante su recorrido. Estos movimientos pueden caracterizarse quizás más fácilmente por tres valores, derivadas los tres de la distancia con respecto a la ubicación a lo largo de la muestra. Estas derivadas pueden resumirse por lo siguiente:

5

<u>Derivada</u>	<u>Concepto análogo más común</u>
primera derivada de la distancia con respecto a la ubicación	velocidad
segunda derivada de la distancia con respecto a la ubicación	aceleración
tercera derivada de la distancia con respecto a la ubicación	tasa de cambio de la aceleración

10

Como se puede comprender a partir de las figuras 6-9c, la boquilla puede presentar cualquier número de superficies de movimiento axial, es decir superficies que tienen influencia sobre la muestra o quizás que solo la confinan según pasa a través de la boquilla. Como se muestra en la figura 6, las superficies de movimiento axial pueden ser pares simétricos y también pueden ser tan sencillas como una primera superficie de movimiento axial (21) y una segunda superficie de movimiento axial (22). Según pasa la muestra hacia abajo por la boquilla (6), estas superficies de movimiento axial pueden actuar de maneras que tienen influencia sobre la muestra o su viabilidad. Por lo tanto, la muestra está sometida (normalmente hidrodinámicamente) a una primera superficie de movimiento axial (21). Entonces, puede pasar a una ubicación de transición (23) para llegar a estar influida por una segunda superficie de movimiento axial (22). Después de la ubicación de transición (23) la muestra está sometida entonces a la segunda superficie de movimiento axial (22). Entonces puede salir de la boquilla tal como en el orificio circular de salida (15).

15

20

Se debería comprender que las superficies de movimiento axial pueden tener cualquier forma. En un sistema, tal como uno que puede tener una velocidad constante, pueden tener una forma tubular. Como se muestra en las figuras 6 y 8, en un sistema tal como uno que consigue una aceleración de la muestra según pasa a través de la boquilla (6), pueden estar configuradas como superficies de aceleración tales como las superficies cónicas mostradas. Por supuesto, la superficie de aceleración también podría decelerar la muestra. Al provocar una aceleración o una deceleración, la superficie actuaría de forma que cambiaría la velocidad de la muestra según pasa a través de la boquilla (6). Por lo tanto, se puede comprender que la muestra (6), tal como se muestra en la figura 8 puede incluir una primera superficie de aceleración axial (24) y una segunda superficie de aceleración axial (25). La primera superficie de aceleración axial (24) hace que la muestra experimente un primer valor (que puede ser constante o no) de aceleración y la segunda superficie de aceleración axial (25) puede hacer que la muestra experimente un segundo valor de aceleración. Este segundo valor de aceleración puede ser distinto o no del primero. Como se muestra en la figura 8, dado que la segunda superficie de aceleración (25) converge a una tasa distinta, probablemente indicaría un valor distinto de aceleración.

25

30

Naturalmente, siempre que hay una aceleración, la muestra puede experimentar una tensión. Esta tensión puede tener un impacto sobre la viabilidad y la funcionalidad de las muestras. Un aspecto particular para algunas muestras, tal como células más largas, puede ser el hecho de que cuando hay un cambio en la velocidad, puede haber diferencias en la tendencia de la velocidad desde un extremo de la muestra hasta el siguiente. Esto puede comprenderse más fácilmente con referencia a una muestra tal como un espermatozoide. Los espermatozoides viables tienen cabezas y colas. Cuando se hace que la cabeza acelere de forma diferencial con respecto a la aceleración de la cola, o cuando se hace que se mueva la cabeza a una velocidad distinta que la de la cola, se puede crear un diferencial desde la cabeza a la cola. Este diferencial puede causar tensión en la célula. En casos extremos, puede incluso separar la cola de la cabeza. Obviamente, esto destruiría la eficacia de la muestra. La presente invención proporciona un sistema mediante el que se puede minimizar esto y se pueden evitar o reducir los efectos no deseables. Esto se lleva a cabo al someter a la muestra a un grado "bajo" de cambios en la aceleración o la velocidad por la longitud de la muestra. Como los expertos en la técnica podrán comprender, "bajo" puede ser un término relativo que puede depender de la célula y del entorno. Se puede determinar de forma teórica o empírica como un valor que se muestra que consigue porcentajes prácticos de eficacia en la muestra para su aplicación específica. Estas probabilidades pueden ser tales como al menos el 70 %, 80 %, 90 % o similar. También se puede aplicar de forma afirmativa la aceleración "baja" o la tasa "baja" de cambio en aceleración.

35

40

45

50

Los cambios en la aceleración o la velocidad pueden producirse cuando cambian las superficies de movimiento axial. Estos cambios pueden ser bruscos o delicados. Naturalmente, algunas realizaciones de la presente invención prefieren los últimos. Con referencia a la figura 6, puede verse cómo un cambio brusco en la superficie de movimiento axial a lo largo del eje puede provocar tensión en la muestra. La primera superficie de movimiento axial (21) cambia de forma discontinua en la ubicación de transición (23). Por ejemplo, cuando se crea la segunda superficie de movimiento axial (22) por un elemento separado, tal como mediante la inserción de una piedra preciosa, puede existir una discontinuidad en la boquilla (6). En tal punto, se puede someter entonces a la muestra a un cambio extremo en la velocidad casi de forma instantánea. Se hará notar que dicho cambio discontinuo puede existir de forma involuntaria, debido a defectos de alineación casi imperceptibles. Independientemente, aspectos como estos pueden tender a separar la muestra. Al proporcionar transiciones que pueden no ser discontinuas, la presente invención puede evitar o minimizar las tensiones creadas de esta manera. La transición puede ser una transición continua como en un área curvada, al tener una cantidad limitada de "discontinuidad" o de defectos de alineación, o puede evitar simplemente la posibilidad de un cambio discontinuo al tener una superficie interior en la boquilla (6) que es unitaria. De esta forma, la

55

60

boquilla puede tener de forma efectiva una superficie unitaria. En una disposición tal, la boquilla (6) puede estar diseñada de manera afirmativa, de forma que presente una transición con una diferenciación máxima de la aceleración. Como se muestra en la figura 8, esto se puede llevar a cabo mediante el diseño en un área de transición de diferenciación de aceleración máxima limitada (26), tal como se muestra entre la primera superficie de movimiento axial y la segunda. También se puede llevar a cabo utilizando un orificio unitario de salida. Entonces, el área de transición de diferenciación de aceleración máxima limitada puede encontrarse en el orificio unitario de salida, o ser un resultado del mismo.

En términos de las tres derivadas de la distancia con respecto a la ubicación mencionada anteriormente, se pueden comprender los anteriores conceptos mediante referencia a las figuras 7 a-c y 9 a-c. Como se muestra, estas figuras son representaciones gráficas de los tres valores de derivada en ubicaciones respectivas en sus boquillas adyacentes mostradas en las figuras 6 y 8. Las Figuras 7a y 9a representan la primera derivada de distancia con respecto a la ubicación, un concepto similar a la velocidad. Dado que la boquilla en la figura 6 tiene un cambio discontinuo en la ubicación de transición (23), puede verse que dl/dl cambia de forma discontinua en la ubicación de transición (23). Para la boquilla (6) en la figura 8, el valor de dl/dl no cambia de forma discontinua. Así la muestra puede tratarse con menos tensión solo por esta razón. En las figuras 7b y 9b, se puede ver que los valores de d^2l/dl^2 para sus boquillas respectivas también son distintos. En la figura 7b, la segunda derivada de la distancia con respecto al valor de la ubicación (o quizás vista más fácilmente como la aceleración) tiene un momento de cambio extremo. De nuevo, esto no está tan presente en la figura 9b. Finalmente, la tercera derivada de la distancia con respecto a los valores de ubicación, d^3l/dl^3 (o quizás vista más fácilmente como la tasa de cambio de la aceleración) también difiere. En la figura 7c, el valor primero se vuelve positivo y luego negativo. En los valores mostrados en la figura 9c, los valores nunca cambian de signo, son bien cero o bien positivos, pero nunca negativos. De forma conveniente se puede construir cada uno de estos conceptos mediante los que comprender y caracterizar la boquilla según está diseñada para evitar o minimizar las tensiones sobre la muestra.

Otro aspecto que puede ser un factor para algunas muestras es el aspecto de la duración de la velocidad, la aceleración o la tasa de cambio de la aceleración según se experimenta por la muestra. Esto también puede ser denominado como el tiempo de permanencia para la muestra. En la citometría de flujo, a menudo existe una necesidad de que se depositen muestras individuales en gotas individuales. Los aspectos tales como este pueden provocar un deseo de transición del fluido en el último momento posible. En los sistemas que intentan hacer esto, puede ser importante prestar atención en particular a las áreas en el entorno desde aproximadamente 100 μm desde el punto de salida (27), áreas más alejadas que 300 μm desde el punto de salida (27), áreas en el entorno del punto de salida (27), o incluso áreas alejadas del punto de salida (27). Además, en algunos sistemas puede ser aceptable someter solo momentáneamente la muestra a los valores no deseados. Por lo tanto, se pueden establecer límites en la boquilla (6) o en ubicaciones específicas dentro de la boquilla (6). Algunos de los límites que pueden aplicarse se exponen en las tablas 1 y 2.

TABLA 1: Valores d^2l/dl^2

0,16 m/segundo por micrómetro en la boquilla,	100×10^{-3} m/segundo por micrómetro a una distancia de más de 300 μm desde el punto de salida, 50×10^{-3} m/segundo por micrómetro a una distancia de más de 300 μm desde el punto de salida,
0,05 m/segundo por micrómetro en la boquilla,	
los anteriores valores desde el entorno del punto de salida,	25×10^{-3} m/segundo por micrómetro a una distancia de más de 300 μm desde el punto de salida,
0,10 m/segundo por micrómetro desde el punto de salida,	valores que no cambian de forma discontinua a lo largo un eje central,
0,13 m/segundo por micrómetro desde el punto de salida,	valores que son, como mucho, cualquiera de los anteriores,
0,16 m/segundo por micrómetro en el entorno del punto de salida,	cualquiera de estos valores en diversas ubicaciones,
0,20 m/segundo por micrómetro en el entorno del punto de salida,	cualquier combinación de estos valores,
0,23 m/segundo por micrómetro en el entorno del punto de salida,	cualesquiera combinaciones de cualquiera de estos valores con cualquiera de los valores de la Tabla 2.

TABLA 2: valores d^3l/dl^3

ES 2 445 520 T3

100.000 x 10 ⁻⁶ m/segundo por micrómetro ² en la boquilla,	el punto de salida
10.000 x 10 ⁻⁶ m/segundo por micrómetro ² en la boquilla,	10.000 x 10 ⁻⁶ m/segundo por micrómetro ² a una distancia del punto de salida,
2.000 x 10 ⁻⁶ m/segundo por micrómetro ² en la boquilla,	una tasa de cambio de los valores de aceleración con respecto a la ubicación axial dado que no cambian de forma discontinua en la boquilla.
1.100 x 10 ⁻⁶ m/segundo por micrómetro ² en la boquilla,	una tasa de cambio de los valores de aceleración o valores d ³ /dl ³ dado que no cambian signo en la boquilla,
los anteriores valores alejados del entorno del punto de salida,	valores que son como mucho cualquiera de los anteriores,
100.000 x 10 ⁻⁶ m/segundo por micrómetro ² desde el punto de salida,	cualquier combinación de los valores anteriores en diversas ubicaciones,
50.000 x 10 ⁻⁶ m/segundo por micrómetro ² desde el punto de salida,	cualquier combinación de los anteriores.
10.000 x 10 ⁻⁶ m/segundo por micrómetro ² desde el punto de salida,	cualquiera de estos valores en diversas ubicaciones,
5.000 x 10 ⁻⁶ m/segundo por micrómetro ² desde el punto de salida,	cualquier combinación de estos valores,
1.000 x 10 ⁻⁶ m/segundo por micrómetro ² desde el punto de salida,	cualquiera de estas combinaciones de cualquiera de estos valores con cualquiera de los valores en la Tabla 1
300 x 10 ⁻⁶ m/segundo por micrómetro ² desde el punto de salida,	
200 x 10 ⁻⁶ m/segundo por micrómetro ² a una distancia desde	

- Al coordinar de manera afirmativa dichos aspectos con muestras específicas, los valores también pueden establecerse en la longitud efectiva de la célula/muestra. Estas longitudes pueden determinarse tanto de forma teórica, medidas como la longitud real de la muestra, o incluso determinarse de forma empírica como una longitud efectiva de la muestra. De nuevo, estas acciones afirmativas o coordinadas tienen como resultado evitar dejar las cosas al azar y pueden permitir seguridad para los usuarios. En las determinaciones empíricas, entre otras, se debería comprender que se pueden escoger los valores conseguidos, de forma que no superen las capacidades prácticas de la muestra a lo largo de su longitud, eso es de tal forma que la muestra retenga una probabilidad suficientemente aceptable de funcionalidad después de procesarse. De estas maneras, coordinando la diferenciación de aceleración máxima, al limitar de manera afirmativa la diferenciación de aceleración máxima y escogiendo de manera afirmativa valores (determinados o no), de tal forma que no superen las capacidades prácticas de la muestra, la presente invención puede conseguir sus fines.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- Como se ha mencionado anteriormente, puede existir sinergia entre este aspecto y el aspecto de alineamiento hidrodinámico de la invención. El giro y la tracción combinados pueden provocar tensión y aparentemente la provocan, en algunas muestras, especialmente en espermatozoides. Por lo tanto la posibilidad de combinar las fuerzas hidrodinámicas torsionales y la máxima diferenciación de la aceleración o los valores similares, estos aspectos también pueden combinarse para minimizar la tensión. También se puede considerar el aspecto de combinar los anteriores valores y conceptos con otros parámetros que es probable que causen tensión en una configuración de citómetro de flujo. Dichos parámetros pueden incluir la operación a tasas de clasificación de al menos 500 clasificaciones por segundo, al menos 1000 clasificaciones por segundo y al menos 1500 clasificaciones por segundo. De forma similar, esto también puede incluir operaciones a 344,7 kPa (50 psi) y similares. Finalmente, como se ha señalado anteriormente, ciertas muestras pueden ser particularmente susceptibles a la tensión, a los aspectos mencionados anteriormente, o a los valores expuestos anteriormente. Esto puede ser particularmente cierto para

espermatozoides, sistemas de recogida de esperma, espermatozoides bovinos, espermatozoides equinos, espermatozoides que han sido teñidos y clasificados por su contenido de ADN (tal como en espermatozoides sexados), espermatozoides bovinos clasificados machos o hembras, e incluso espermatozoides equinos clasificados machos o hembras.

5

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de citómetro de flujo, que comprende:
- 5 a. un tubo de inyección de muestras (3) que tiene un punto de inyección a través del que se puede introducir una muestra,
- b. un recipiente de fluido envolvente (1) que tiene un extremo inferior y en el que dicho tubo de inyección de muestras (3) está localizado dentro de dicho recipiente de fluido envolvente (1),
- 10 c. una vía de acceso de fluido envolvente conectada a dicho recipiente de fluido envolvente (1),
- d. una boquilla de una sola orientación torsional (6) localizada al menos en parte debajo de dicho punto de inyección, y
- 15 e. un sistema analítico que detecta por debajo de dicha boquilla de una sola orientación torsional (6);
- en el que dicha boquilla de una sola orientación torsional (6) comprende un elemento de una sola superficie interior torsional que tiene un elemento de una sola superficie interior torsional, elipsoidal ahusado, que está dividido en una zona interior elíptica ahusada (c) y una zona interior cilíndrica (d) y en el que la zona interior elíptica ahusada (c) está
- 20 conectada directamente a la zona interior cilíndrica (d) y un orificio circular de salida (15) de la boquilla (6).
2. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 1 y que comprende adicionalmente un sistema de recogida de esperma.
- 25 3. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 1, en el que dicho elemento de una sola superficie interior torsional, elipsoidal ahusado, comprende:
- a. una ubicación de demarcación en forma de elipse (9) localizada en aproximadamente dicho punto de inyección, y
- 30 b. una zona de elipticidad decreciente (10) que se extiende desde debajo de dicha ubicación de demarcación en forma de elipse (9).
4. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 1, en el que dicha zona interior ahusada (c), en forma de elipse, comprende:
- 35 a. una zona de elipticidad creciente (8);
- b. una ubicación de demarcación en forma de elipse (9) corriente abajo a partir de dicha zona de elipticidad creciente (8); y
- 40 c. una zona de elipticidad decreciente (10) que se extiende desde dicha ubicación de demarcación en forma de elipse (9).
5. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 3 o 4 y que comprende adicionalmente:
- 45 a. una zona cónica (12) localizada debajo de dicha zona de elipticidad decreciente (10); y en el que
- b. dicha zona cilíndrica (14) localizada debajo de dicha zona cónica (12); en la que tanto dicha zona cónica (12) como dicha zona cilíndrica (14) comprenden un superficie de flujo laminar;
- 50 c. el orificio circular de salida (15) localizado debajo de dicha zona cilíndrica (14);
- d. un oscilador para el que dicho orificio circular de salida (15) tiene capacidad de respuesta; y
- 55 e. un sistema de clasificación de citometría de flujo por debajo de dicha boquilla de una sola orientación torsional (6).
6. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 5, en el que dicho elemento de una sola superficie interior torsional, elipsoidal ahusado, dicha zona cónica (12) y dicha zona cilíndrica (14) son unitarias.
- 60 7. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 6, en el que dicha boquilla de una sola orientación torsional (6) tiene una dirección corriente abajo, en el que dicha zona de elipticidad decreciente (10) tiene cortes transversales y áreas de corte transversal, en los que dichos cortes transversales de dicha zona de elipticidad decreciente (10) sufren cambios de transición de formas similares a elipse a formas circulares corriente abajo y en los que dichas áreas de corte transversal llegan a ser progresivamente más pequeñas corriente abajo.
- 65 8. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 7, en el que cada una de dichas secciones

transversales de dicha zona de decrecimiento elipsoidal (10) tiene un eje mayor y un eje menor y en el que dicho eje mayor y dicho eje menor llegan a ser progresivamente iguales corriente abajo.

- 5 9. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 5, en el que dicho elemento de una sola superficie interior torsional, elipsoidal ahusado, comprende un elemento de superficie interior que se ahúsa a aproximadamente 23°.
- 10 10. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 6, en el que dicho elemento de una sola superficie interior torsional, elipsoidal ahusado, tiene una boca (11) y en el que dicha boca (11) es de aproximadamente 25 mm de diámetro y dicho orificio circular de salida (15) es de aproximadamente 0,07 mm de diámetro.
- 15 11. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 4, en el que dicho tubo de inyección de muestras que mejora la orientación comprende una punta biselada (4).
12. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 11, en el que dicha punta biselada tiene una boca circular (5) y en el que dicha boca circular (5) tiene un diámetro de aproximadamente 0,01 mm.
- 20 13. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 11, en el que dicha zona interior elipsoidal tiene un eje mayor y un eje menor en dicho punto de inyección y en la que dicho eje mayor de dicha punta biselada (4) está alineado con dicho eje mayor de dicha zona interior elipsoidal ahusada en dicho punto de inyección.
- 25 14. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 13, en el que dicho punto de inyección está localizado aproximadamente a 6 mm desde dicho orificio circular de salida (15) de dicha boquilla de una sola orientación torsional (6).
15. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 1, en el que dicha muestra comprende espermatozoides en un tampón compatible con esperma.
- 30 16. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 15, en el que dicho sistema analítico comprende un sistema de clasificación por citometría de flujo.
17. Un sistema de citómetro de flujo como se describe en la reivindicación 15 y que además comprende un sistema de recogida compatible con esperma.

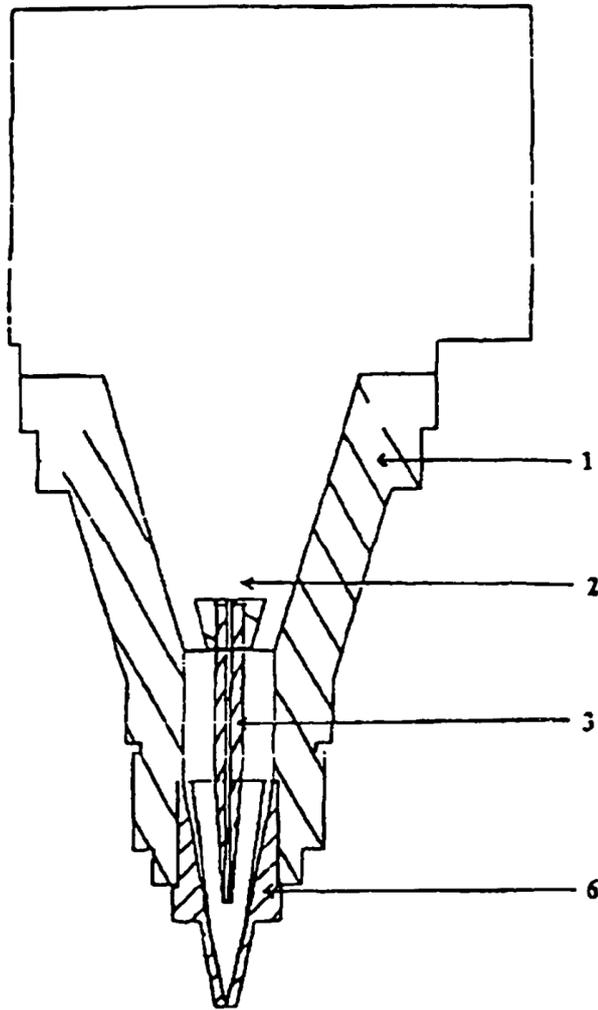


FIG. 1

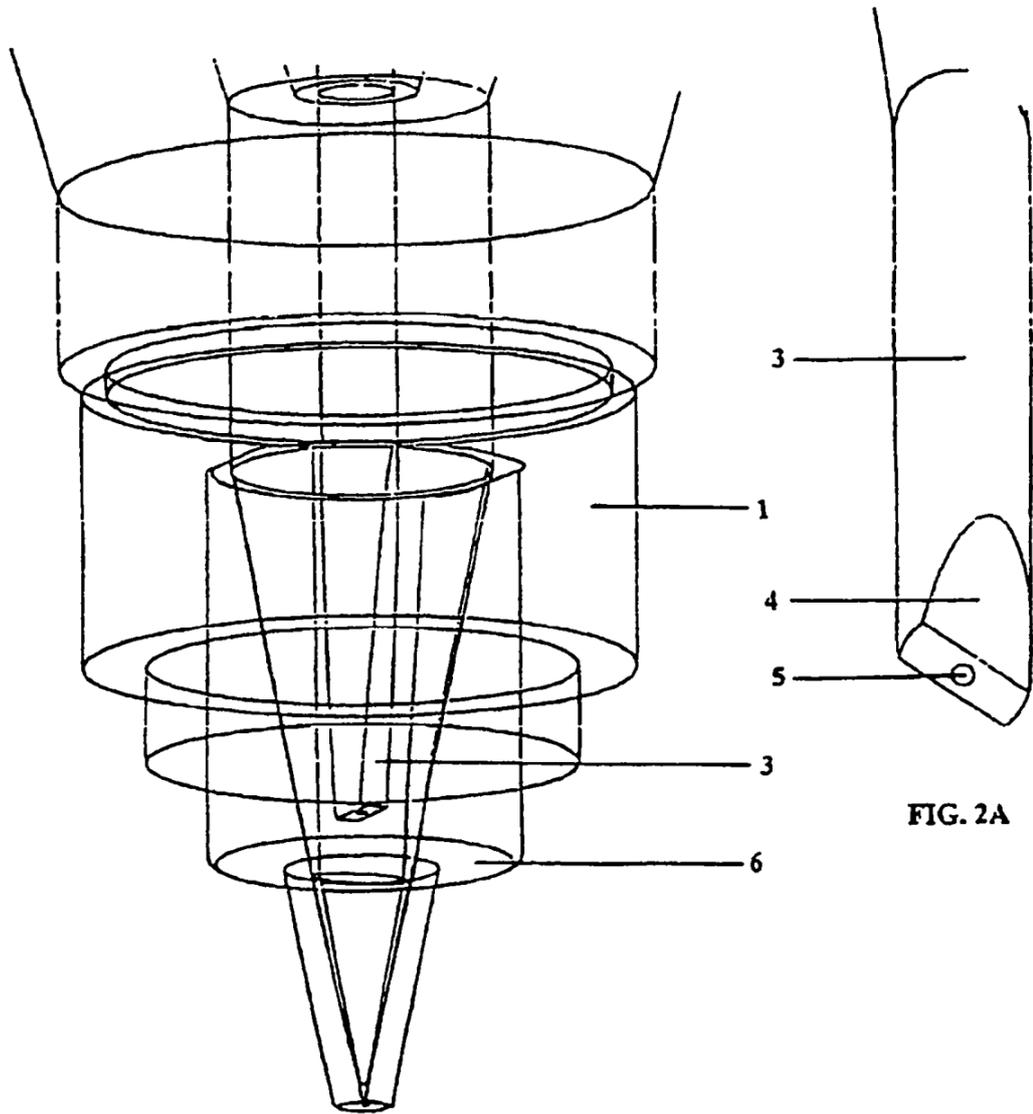
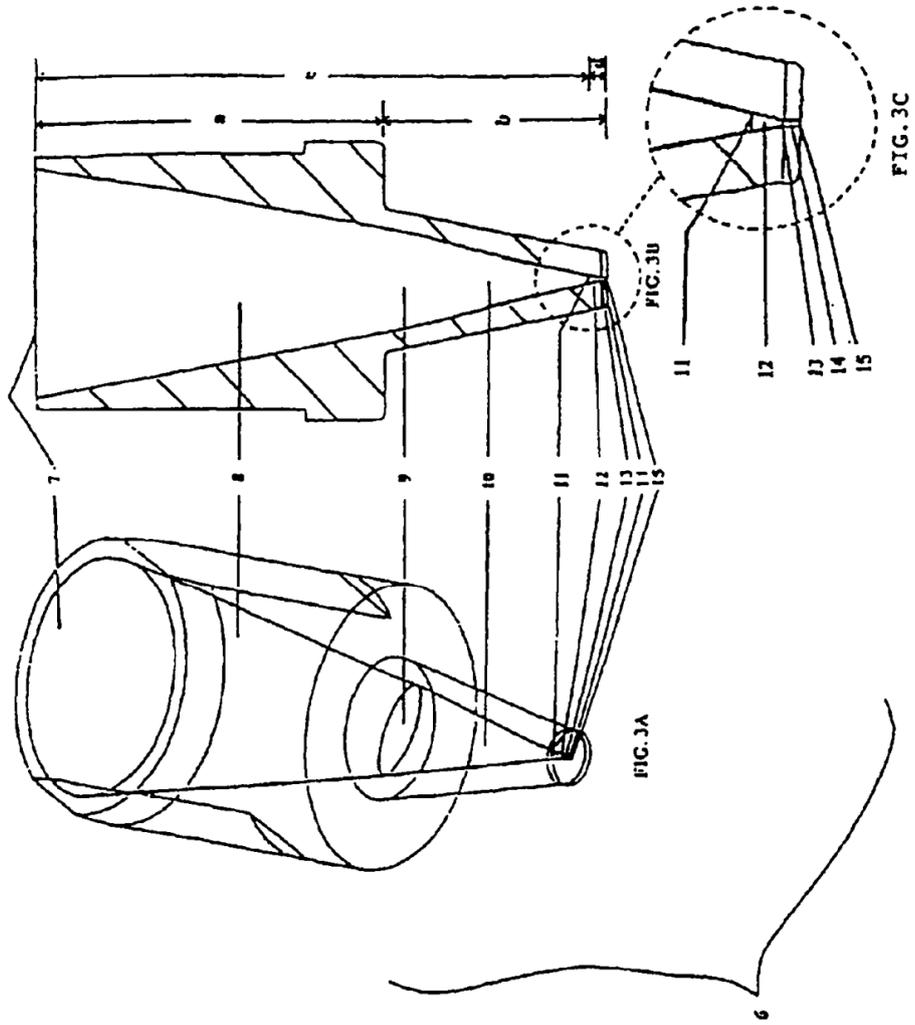


FIG. 2

FIG. 2A



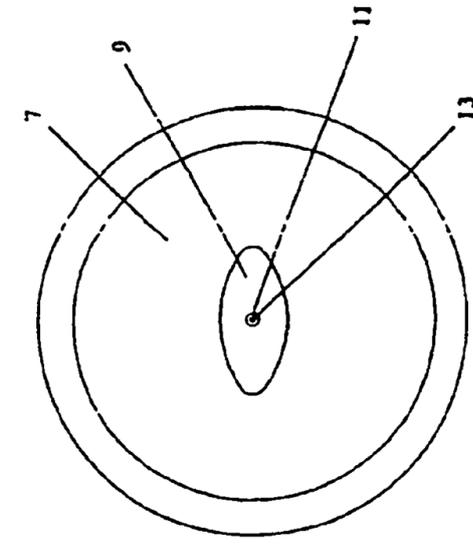


FIG. 4B

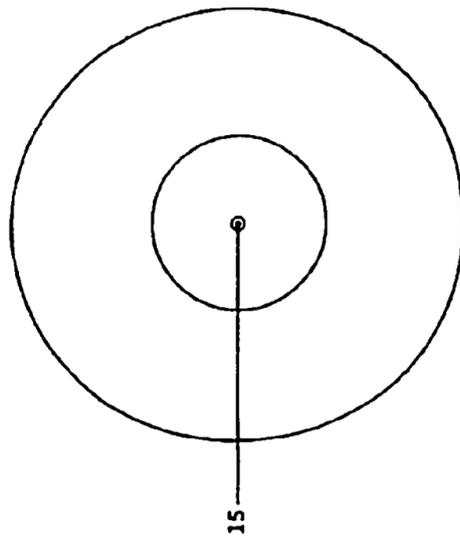


FIG. 4A

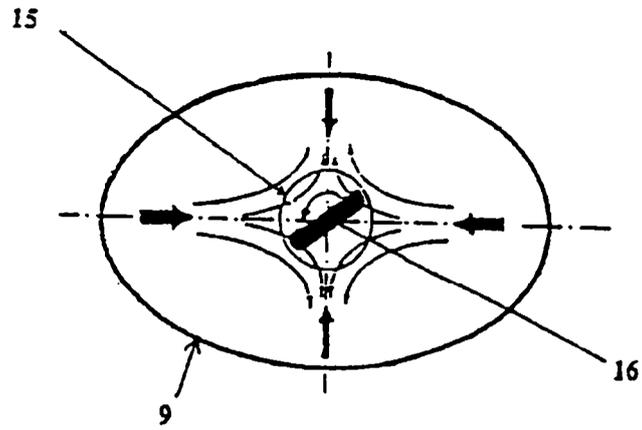


FIG. 5

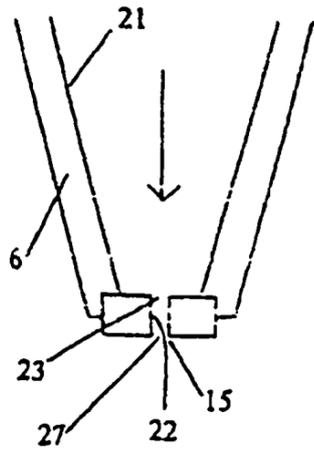


Fig. 6

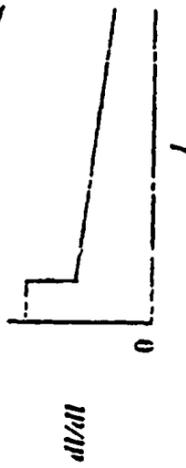


Fig. 7a

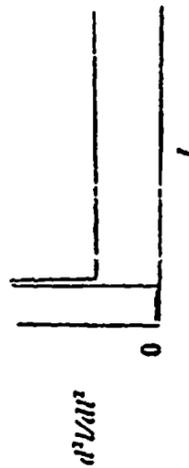


Fig. 7b

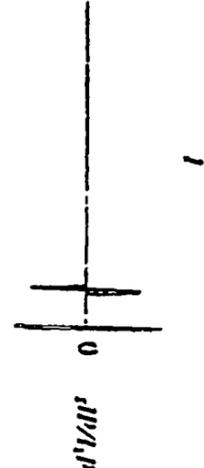


Fig. 7c

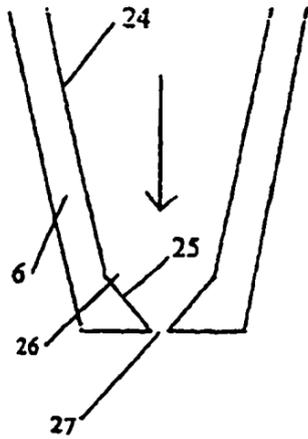


Fig. 8



Fig. 9a

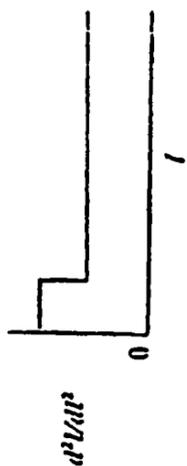


Fig. 9b

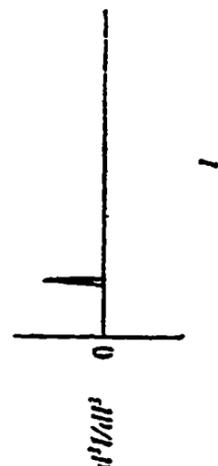


Fig. 9c