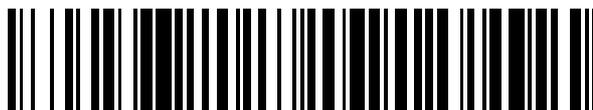


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 121**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2004 E 04752469 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1625203**

54 Título: **Clasificación eficiente de células haploides por sistemas de citometría de flujo**

30 Prioridad:

15.05.2003 US 471509 P

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

16.07.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**EVANS, KENNETH M.;
GILLIGAN, THOMAS B.;
SUH, TAE KWANG y
COX, TODD A.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 541 121 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

Clasificación eficiente de células haploides por sistemas de citometría de flujo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo. Más específicamente, la invención se refiere al uso de un láser pulsado en un sistema de flujo para el análisis de partículas que se traduce en una cuantificación más precisa de las propiedades medibles de las partículas individuales. Puede ser de particular interés en el análisis de poblaciones de partículas muy similares, a altas velocidades, lo que permite una separación más eficiente de las partículas en dos o más poblaciones diferentes. La invención es particularmente útil en la aplicación de la separación de esperma en vivo que transporta al cromosoma X y al cromosoma Y de todos los mamíferos a velocidades más altas, mejor grado de pureza y con resultados iguales o mejores en la salud del esperma, es decir, con menos daño para el esperma. La invención puede contribuir a lograr mejoras significativas a la economía de la clasificación del esperma.

II. Antecedentes de la invención

Los láseres pueden ser utilizados para suministrar luz a partículas biológicas o no biológicas y los espectros de emisión se pueden utilizar para el análisis de características de las partículas. En algunos casos, esto se puede aplicar por ejemplo donde una partícula es en sí misma fluorescente o por sí misma absorbe color, está asociada por afinidad, avidez, enlaces covalentes, o bien a otra molécula que puede ser coloreada o fluorescente, puede estar asociada a otra molécula que es coloreada o fluorescente a través de una interacción macromolecular biológica o modelada específica, tal como un evento de enlazamiento a un anticuerpo o un oligómero de ácido nucleico o un evento de hibridación de ácido polinucleico, puede obtener color o fluorescencia, tal como a través de un evento de síntesis enzimática, una unión enzimática o reacción de escisión, conversión enzimática de un sustrato, la asociación de una molécula fluorescente con un inactivador cercano, la reacción de un producto en ciertas concentraciones de protón local (pH) o NADH o NADPH o ATP o hidruro libre (H-) o hidruro enlazado R-(H-) concentraciones, o puede ganar color o fluorescencia por medio de una variedad de métodos para asociar luz emitida o absorbida (radiación electromagnética, REM).

Los láseres convencionales pueden generar una fuente de luz fuerte, tal vez intensa. A través de las propiedades de coherencia del haz tal luz puede viajar distancias muy largas, tal vez a través de espejos reflectantes que pueden cambiar el ángulo del haz de iluminación de luz, quizás a través de prismas u objetos refractantes o lentes que pueden dividir el haz en dos o más haces de igual o diferente intensidad, o pueden desenfocar, tal vez expandir, o enfocar, quizás concentrar, el haz. Tal luz también puede verse afectada por filtros que pueden reducir la energía neta del haz. La mayoría de los láseres también permiten la modulación de la intensidad de la luz, tal vez vatios, en el haz mediante el ajuste de una corriente de entrada desde una fuente de alimentación hacia el elemento generador de luz.

En algunas aplicaciones, los láseres convencionales utilizados en el análisis y la cuantificación de los objetos biológicos pueden combinarse con detectores de luz sensibles que pueden ser tan simples, tales como una película fotográfica o papel, o pueden ser más complejos, tales como un tubo fotomultiplicador. A menudo, un detector de luz puede recopilar sólo información sobre una cantidad acumulada de luz, tal vez radiación electromagnética, REM, o puede recopilar e informar sobre los cambios dinámicos en la intensidad de la luz o REM que incide en todas o en partes de regiones localizadas, o posiciones sobre la superficie del detector. El detector de luz también puede implicar el uso de un dispositivo de acoplamiento fotoeléctrico, que puede permitir que la energía de los fotones absorbidos en la REM por el detector de luz se convierta en una corriente proporcional a la luz incidente o REM sobre la superficie del detector de luz. El dispositivo de acoplamiento fotoeléctrico incluso puede estar integrado en un circuito electrónico con un amplificador que puede aumentar la señal o crear ganancia de tal forma que las fluctuaciones o quizás la suma de la corriente amplificada puede estar disponible para un circuito lógico análogo o digital. Los diseños también pueden transmitir una señal o conjunto de datos a un usuario de un instrumento de análisis de partículas y esta señal puede ser proporcional a la intensidad estática, acumulativa, o tal vez incluso dinámica de la luz o REM incidente sobre el detector.

En ciertos usos de la luz láser para analizar partículas biológicas, un detector puede medir el cambio en la intensidad de la fuente de luz después de la incidencia sobre una(s) partícula(s) que es analizado usando un haz de referencia que toma un camino sin incidir sobre la(s) partícula(s). En otros usos de la luz láser, partículas modificadas o no modificadas absorben una fracción de la luz de iluminación o REM y pueden emitir luz de una frecuencia diferente.

En muchos casos, la presencia de luz de emisión o REM de una cierta longitud de onda se puede utilizar para identificar o cuantificar características asociadas con partículas específicas, o medir cuantitativamente la cantidad o el número de las partículas biológicas específicas presentes en la muestra o en una región específica o posición en la muestra.

En algunos casos, puede ser útil determinar con precisión diferencias muy pequeñas en la luz de iluminación o en la luz de emisión de dos partículas biológicas muy similares (por ejemplo una célula de esperma que porta el

5 cromosoma X en comparación con una célula de esperma que porta el cromosoma Y). Estas pequeñas diferencias pueden ser analizadas por medio de la presentación en serie de tal vez 50.000 eventos de emisión separados por segundo en una corriente de líquido. Estas también pueden ser miles de emisiones separadas de moléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas) en un campo de matriz que permite el análisis de bibliotecas genética, genómica, proteómica, o glicómica.

10 El tipo tradicional de láser utilizado para el análisis de partículas en citometría de flujo es un láser de onda continua (OC). A menudo, este proporciona un haz de intensidad constante. Sin embargo, en algunos casos, los láseres de OC pueden tener desventajas particulares para aplicaciones como se discute aquí. El haz puede dar lugar a la modificación o destrucción de la muestra que está siendo observada. Por ejemplo, con respecto a las células espermáticas, la irradiación puede resultar en una menor fertilidad de los espermatozoides. En segundo lugar, en algunos casos cuando el rayo láser opera de forma continua, puede ser deseable tener un método de interrumpir el haz si se mueve desde un primer sitio de incidencia a un segundo sitio de incidencia sin iluminación de las zonas intermedias.

15 En la patente de los Estados Unidos No. 5.596.401 de Kusuzawa, se puede utilizar un láser pulsado para obtener imágenes de un objeto, tal como una célula, en un citómetro de flujo. Esta divulgación puede estar relacionada con mejoras en la captura de imágenes de partículas tales como las modulaciones de reducción de la coherencia. Kusuzawa puede enseñar el uso de un láser de onda continua para la detección de partículas y la formación de imágenes.

20 En la patente de los Estados Unidos No. 5.895.922 y la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2003/0098421 de Ho, se puede utilizar la luz láser pulsado para iluminar y detectar partículas biológicas peligrosas dispersas en una corriente de flujo de aire. La invención puede incluir una luz láser ultravioleta y la búsqueda de la emisión de fluorescencia de partículas biológicas potencialmente peligrosas. Esta divulgación puede enseñar las desventajas de un aparato de diodo láser.

25 La patente de los Estados Unidos No. 6.177.277 de Soini, describe el empleo de una configuración óptima de excitación de dos fotones y/o confocal. La invención puede referirse a la utilización de la óptica confocal para reducir el volumen de análisis hasta aproximadamente 10% del volumen de análisis estándar en un citómetro de flujo. Un láser pulsado puede proporcionar pulsos cortos de luz intensa y puede permitir la absorción simultánea de dos fotones de modo que la longitud de onda del haz de luz de iluminación puede ser más larga que una ráfaga emitida de fotones individuales. Se puede reducir la señal de fondo mediante el uso de un filtro. La invención puede incluir el procesamiento de señales duales. La invención como se describe en Soini, puede ser beneficiosa en el análisis de pequeñas partículas tales como eritrocitos y células bacterianas.

30 En la patente de los Estados Unidos No. 6.671.044 de Ortyn, se puede usar una óptica y un equipo de análisis especial en un citómetro de flujo para formación de imágenes. La divulgación de Ortyn puede incluir el análisis del sexo de células fetales en la sangre materna como un método para determinar el sexo de un niño durante el embarazo temprano. Ortyn puede indicar que las velocidades de análisis de un citómetro de flujo de formación de imágenes pueden estar restringidas a maximizar teóricamente a razón de 500 células por segundo.

35 Con respecto al análisis de partículas usando luz láser, la presente invención divulga la tecnología que se ocupa de cada uno de los problemas mencionados anteriormente.

40 Para los fines de esta invención, se puede usar un láser pulsado de alta intensidad, pulsado rápidamente. Este láser puede suministrar pulsos cortos de alta intensidad tal vez con duración de aproximadamente 5-20 picosegundos, seguidos por intervalos entre pulsos que son 100-1000 veces más largos que los pulsos o aproximadamente 0,5-20 nanosegundos. La luz puede tener intensidades de pico muy altas durante un período de aproximadamente 5-20 picosegundos y energías netas bajas en el periodo de aproximadamente 2-10 microsegundos.

45 La citometría de flujo, que utiliza un análisis de células de alta velocidad, o un análisis de células de alta velocidad y un instrumento de clasificación, a menudo se basa en una fuente de luz láser para iluminar una corriente de fluido en la que son arrastradas las partículas. Las partículas pueden ser obligadas a fluir por un punto de la iluminación a una velocidad rápida, a menudo en el intervalo de 500 a 100.000 partículas por segundo. A menudo, la luz de la fuente de láser que ilumina es de intensidad constante. Las partículas en la corriente de análisis pueden ser del mismo tamaño, y pueden gastar la misma cantidad de tiempo dentro de la zona de iluminación. La cantidad de luz que ilumina cada partícula en una gran población de partículas analizadas en serie puede ser idéntica. Un detector puede ser capaz de medir la luz dispersada, u otros tipos de luz emitida por la partícula como resultado de la autofluorescencia o fluorescencia asociada con un compuesto químico, colorante, complejo colorante, o colorante conjugado que puede ser dirigido a uno o más tipos de especies moleculares contenidas en o dentro de las partículas en la población y pueden determinar la identidad de una partícula y, en algunos casos, realizar una medición de la cantidad de un objetivo molecular específico asociado con la partícula. Una estructura molecular específica en o incluso dentro de una partícula puede ser caracterizada y una medición cuantitativa de la cantidad de estructura molecular asociada en o incluso dentro de una partícula, puede proporcionar información que puede ser utilizada como base para la clasificación o separar un tipo de partícula de otro.

5 En un citómetro de flujo, puede haber un período de tiempo muy corto entre el momento exacto en que una partícula es iluminada y el momento exacto en que una manipulación física o una manipulación eléctrica, pueden ser activadas para provocar la separación de una partícula específica de una corriente que contiene diferentes partículas. Un ejemplo de una manipulación física puede ser mediante la carga de una gotita. Una duración específica puede ser llamada un periodo de retardo de gota, y la duración puede ser tal vez tan breve como unos 100 microsegundos o tal vez tan largo como aproximadamente 10 milisegundos, y puede incluso ser de aproximadamente 1 milisegundo. En el caso de la clasificación de partículas, la información puede ser detectada a partir de cada partícula, se puede realizar un análisis por ordenador de la información, y se puede llevar a cabo con precisión la comparación del análisis por ordenador con un valor de compuerta o tal vez incluso unos criterios de selección dentro de un periodo de tiempo más corto que la duración del retardo de gota.

10 Los sistemas de citometría de flujo pueden ser útiles para medir una cantidad promedio de una molécula específica presente en o incluso dentro de una población de partículas. Los sistemas anteriores pueden no haber medido la cantidad exacta de una molécula específica en o incluso dentro de una población de partículas. Los factores que pueden contribuir a mediciones inexactas de las partículas individuales pueden incluir la saturación de un colorante o incluso un conjugado con una partícula, la variación en los cuantos de la luz de iluminación, los efectos de la forma de una partícula, y quizás incluso ruido electrónico en el aparato de detección.

15 Un ejemplo de un problema particularmente difícil es la clasificación de espermatozoides que contiene al cromosoma X y el cromosoma Y de mamíferos con altas velocidades de procesamiento y elevada pureza de clasificación. La población de espermatozoides en la mayoría de los mamíferos es de aproximadamente 50% de contenido del cromosoma X y aproximadamente 50% de contenido del cromosoma Y. Un colorante, tal como Hoechst 33342, puede formar complejos con ADN bicatenario. Una medida de complejo total de Hoechst 33342-ADN en cada espermatozoides se puede correlacionar con la cantidad total de ADN en cada espermatozoides. En general, los mamíferos tienen más cromosomas X que cromosomas Y, y pueden tener un diferencial entre el contenido total de ADN del espermatozoides que contiene cromosoma X sobre el espermatozoides que contiene cromosoma Y para los diversos mamíferos. Tales diferencias pueden incluir: humano que tiene aproximadamente 2,8%; conejo que tiene aproximadamente 3,0%; cerdo que tiene aproximadamente 3,6%; caballo que tiene aproximadamente 3,7%; vaca que tiene aproximadamente 3,8%; perro que tiene aproximadamente 3,9%; delfín que tiene aproximadamente 4,0%; y oveja que tiene aproximadamente 4,2%. Los diferenciales pueden correlacionarse con una diferencia relativa de intensidades emitidas desde un espermatozoides teñido que es clasificado con el propósito de separación del espermatozoides que contiene cromosoma X y el espermatozoides que contiene cromosoma Y.

20 Se han hecho logros significativos en el desarrollo de las condiciones de coloración para teñir el ADN en el espermatozoides vivo con Hoechst 33342, tales como, el uso de sistemas de detección ortogonales duales para determinar la orientación del espermatozoides, el uso de fluidos hidrodinámicos para aumentar la cantidad de espermatozoides orientado correctamente, el ajuste de la ganancia en los detectores, e incluso el uso de electrónica de alta velocidad. En el uso más eficiente de dichos logros, puede ser posible en la mayoría de los mamíferos clasificar simultáneamente el espermatozoides en dos poblaciones, la que contiene al cromosoma X, y la que contiene el cromosoma Y, a velocidades de 2.500 por segundo o superiores. También puede ser posible clasificar el espermatozoides hasta purezas del 90% o incluso superiores. Puede presentarse, sin embargo, un problema distinto ya que a velocidades superiores a 2.500 por segundo, la pureza de la muestra puede disminuir.

25 Este problema se puede entender debido a la observación de que el coeficiente de variación (CV) posiblemente incluso en los mejores procedimientos de clasificación del espermatozoides puede estar entre aproximadamente 0,7%-1,5%, y con condiciones pobres pueden incluso estar entre aproximadamente 2%-5%. Dado que la diferencia en el ADN entre el espermatozoides que contiene al cromosoma X y el espermatozoides que contiene al cromosoma Y de cojinete en los mamíferos puede ser tan baja como 2,8% como se observa en los seres humanos y tan alto como del 7,5% como se puede observar en las chinchillas, el CV puede ser más bajo que el diferencial de ADN con el fin de lograr una separación suficiente grande de las dos poblaciones. Los seres humanos tienen uno de los diferenciales de ADN más bajos conocidos y pueden tener algunas de las purezas máximas más bajas conocidas en la clasificación. Puede ser deseable mejorar los procedimientos que puedan reducir el CV.

30 Un método que se ha demostrado que mejora el CV puede ser el uso de más altas intensidades de iluminación con luz láser. Por ejemplo, se sabe que el uso de láseres de onda continua para clasificar varias especies de espermatozoides con entre aproximadamente 100-200 milivatios de iluminación láser, y, posiblemente, con alrededor de 150 milivatios. Se ha observado que duplicar o triplicar la intensidad y el aumento de la potencia hasta aproximadamente 300-500 mW puede mejorar el CV. Un CV mejorado puede ser más evidente por el análisis de la "división" entre dos picos en un histograma. Sin embargo, puede haber problemas asociados con un incremento de la intensidad o quizás incluso un incremento de la potencia con un láser de onda continua. En el caso del análisis de un complejo de ADN-Hoechst 33342 con un láser de onda continua, la fuente de luz puede estar cerca de un espectro UV y puede tener algún efecto ionizante sobre el complejo de ADN. La ionización puede causar entonces cambios en el ADN. Por lo tanto, el espermatozoides clasificado con láseres de onda continua de alta intensidad tal como 300-500 mW puede no ser tan fértil. Otro problema puede incluir la energía que puede llevar a un láser continuo a suministrar cerca de 150 mW de energía en el espectro UV cercano. Los láseres de onda continua pueden requerir 10.000 mW o tal vez más de poder. Dado que ya puede haber una gran cantidad de energía eléctrica necesaria para operar un

láser de onda continua a 150 mW, se puede requerir una cantidad mucho mayor de potencia para operar un láser de onda continua a potencias más altas. Por otra parte, la vida del tubo de los láseres de iones puede reducirse cuando se opera a potencias superiores. Un problema adicional con el uso de láseres de onda continua puede ser que el CV puede caer significativamente cuando se utilizan potencias inferiores, tales como entre aproximadamente 20-80 mW.

El documento WO 00/06193 se refiere a la inseminación artificial de equinos y al uso de un citómetro de flujo para clasificar las células espermáticas. Se divulga que la estimulación con luz se lleva a cabo mediante un excitador láser. Se utilizó un láser de argón en el método de clasificación. No se menciona el uso de un láser pulsado en el método de clasificación.

La solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2002/0030812 A1 describe un sistema de formación de imágenes para formación de imágenes de objetos o partículas en movimiento para el análisis de la morfología de objetos tales como las células y para la detección de la composición de sondas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) dentro de las células. Se describe el análisis de células raras en la sangre con el fin hacer diagnósticos no invasivos de células fetales y la detección de cáncer. Se menciona un láser pulsado como fuente de luz.

G.E. Seidel y D.L. Garner, *Reproduction* (2002) 124, 733-743 reportan inseminación artificial con espermatozoides sexuales por citometría de flujo y clasificación de células. Se menciona además que los espermatozoides sufren daños durante la clasificación. Las moléculas de colorante enlazadas al ADN pueden ser excitadas mediante luz láser pulsada o de onda continua para emitir luz fluorescente de tal manera que se puedan discriminar las células espermáticas que contienen al cromosoma X y que contienen al cromosoma Y.

En formas de realización, la presente invención proporciona diseños de citómetros de flujo que incorporan el uso de 2 o más boquillas de flujo, e incluso tantas como decenas de boquillas de flujo, posiblemente operadas por un único instrumento de clasificación. Campos como los microfluidos, óptica, electrónica, e incluso el procesamiento en paralelo pueden ser explorados. En otras realizaciones, la presente invención incluye el uso de divisores de haz para crear múltiples haces de luz. Sin embargo, un problema importante que enfrenta el desarrollo del análisis de flujos confiables y la clasificación de flujos en paralelo puede ser la alta intensidad de la luz láser necesaria para el análisis en cada boquilla. Este problema es particularmente relevante para aplicaciones que requieren un CV muy bajo en la medición de partículas idénticas.

Existe la necesidad de proporcionar sistemas de flujo para el análisis y clasificación de partículas que requieren un bajo valor de CV, incluso se pueden requerir mayores intensidades de luz láser, incluso mayores intensidades pueden tener efectos negativos en el esperma y que requieren mayor potencia. En la búsqueda de soluciones a los problemas en los sistemas de flujo para el análisis y la clasificación de partículas, el campo de los láseres pulsados representa una posible solución.

Sorprendentemente, aunque el esperma clasificado en un citómetro de flujo de alta velocidad puede ser dañado por la luz UV entre aproximadamente 300-500 mW, ahora se muestra en esta invención que las potencias comprendidas entre 100-500 mW pueden no ser perjudiciales para el esperma si se suministran en pulsos. En formas de realización, esto puede incluir un pulso que tenga una intensidad de pico posiblemente tanto como 1000 veces mayor que la intensidad de un láser de onda continua. Los láseres pulsados pueden ser diseñados como láseres de onda casi continua y pueden tener tasas de repetición tan rápidas como entre aproximadamente 50-200 Megahercios e incluso hasta 80 Megahercios. En formas de realización, los impulsos puede estar entre aproximadamente 5-20 picosegundos. Los láseres pulsados pueden ser ideales para proporcionar luz pulsada a una corriente de partículas que es analizada en una celda de flujo o un citómetro de flujo. Las partículas analizadas en citómetros de flujo con tasas de eventos posiblemente entre 10.000-100.000 Hertz, e incluso entre 20.000-60.000 Hertz, pueden ser iluminadas usando desde unos pocos cientos de pulsos de un láser que tiene tasas de repetición cercanas a 80.000 Hertz. Cada pulso puede proporcionar una cantidad intensa de energía.

Puede haber ciertos usos industriales de citómetros de flujo, como instrumentos preparativos, que pueden estar limitados económicamente por los métodos tradicionales de procesamiento. Puede ser deseable proporcionar sistemas que faciliten el procesamiento paralelo para industrias tales como las que procesan rápidamente eyaculados de mamíferos para la producción de un gran cantidad de esperma vivo para inseminación, aquellas que procesan muestras de sangre para la recuperación de células especificadas, tales como células fetales, glóbulos blancos, células madre, células hematopoyéticas de la médula ósea, y similares. En una realización de la presente invención, formas especiales de luz láser pulsado pueden permitir que un solo láser ilumine una pluralidad de boquillas, tal vez incluso aunque no se reduzca el CV de las muestras analizadas.

Como resultado, mediante el uso de formas especiales de luz láser pulsado, se pueden observar mejoras adicionales en la velocidad y la pureza de las muestras. Estos tipos de láser pueden ser esenciales en el diseño y desarrollo de nuevos citómetros de flujo que quizás tengan también múltiples flujos de clasificación.

III. Resumen de la invención

Por consiguiente, un objetivo más amplio de la invención puede proporcionar un método de procesamiento de

muestras por citometría de flujo que involucra un láser pulsado que puede ser operado a una potencia baja.

5 Otro objetivo más amplio de la invención puede proporcionar un método de procesamiento de muestras por citometría de flujo que involucra un láser pulsado que puede permitir la detección de diferencias más pequeñas en la iluminación o emisión para diferenciar una característica de la partícula.

10 Incluso otro objetivo más amplio de la invención puede proporcionar un método de procesamiento de muestras por citometría de flujo que involucra un láser pulsado que permite separar las partículas diferenciadas (aquí: células espermáticas) en subpoblaciones que tienen una mayor incidencia de la característica deseada.

Otro objetivo más amplio de la invención puede proporcionar un método de procesamiento de muestras por citometría de flujo que involucra un láser pulsado que permite que múltiples sistemas de diferenciación de partículas sean ejecutados simultáneamente usando un solo láser.

15 Otro objetivo más amplio de la invención puede proporcionar un método de procesamiento de muestras por citometría de flujo que involucra un láser pulsado que proporciona un mayor poder de resolución que los sistemas convencionales de análisis de partículas utilizando un láser de OC.

20 Otro objetivo más amplio de la invención puede proporcionar un método de procesamiento de muestras por citometría de flujo que involucra un láser pulsado que genera a partir de fluorocromos (aquí: Hoechst 33342) tras la irradiación una mayor intensidad de luz que los sistemas convencionales de análisis de partículas que utilizan un láser de OC.

25 Otro objetivo más amplio de la invención puede proporcionar un método de procesamiento de muestras por citometría de flujo que involucra un láser pulsado que permite separar las partículas diferenciadas (aquí: células espermáticas) en subpoblaciones a una velocidad mayor que los sistemas convencionales de análisis de partículas que utilizan un láser de OC.

30 Otro objetivo más amplio de la invención puede proporcionar un método de procesamiento de muestras por citometría de flujo que involucra un láser pulsado que permite que las células espermáticas de cualquier especie de mamífero sean diferenciadas con mayor resolución en subpoblaciones que contienen al cromosoma X o que contienen al cromosoma Y. Los beneficios de este objetivo de la invención pueden permitir la diferenciación de las células espermáticas que tienen: menos fluorocromo enlazado al ADN, menos tiempo de residencia en protocolos de coloración, mayor tiempo de almacenamiento transcurrido antes de la clasificación, o quizás incluso menos afinidad para teñir debido a haber sido congelado antes de los protocolos de tinción.

35 Otro objetivo más amplio de la invención puede proporcionar un método de procesamiento de muestras por citometría de flujo que involucra un láser pulsado que permite que las células espermáticas sean separadas en subpoblaciones que contienen al cromosoma X o al cromosoma Y cojinete que tienen una mayor pureza o separarlas en subpoblaciones que contienen al cromosoma X o al cromosoma Y en una mayor cantidad por segundo.

40 Incluso otro objetivo más amplio de la invención puede ser proporcionar el uso de un citómetro de flujo miniaturizado y paralelo que permite que una multiplicidad de boquillas de clasificación en tándem sean colocadas en el mismo aparato, lo que puede permitir aumentos en la velocidad de producción de la clasificación, al aumentar el número de boquillas que están clasificando en un solo aparato.

45 Naturalmente, otros objetivos independientes de la invención se describen a lo largo de otras partes de la memoria descriptiva.

50 Estos objetivos se consiguen mediante un método de procesamiento de muestras por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1.

55 IV. Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona un diagrama de bloques de una realización de un sistema de análisis de partículas que puede ser usado en la invención que incluye manipuladores del haz, tales como elementos ópticos, divisores, filtros, direccionales.

60 La Figura 2 proporciona otras realizaciones de manipuladores del haz.

La Figura 3 representa un sistema conectado de manera fluida de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención.

65 La Figura 4 es una representación simplificada de un pulso representativo de la radiación que puede ser utilizado en algunas realizaciones.

- La Figura 5 proporciona ilustraciones de características de un haz de iluminación pulsado.
- 5 La Figura 6 proporciona ilustraciones que pueden diferenciar las características de un haz de radiación pulsada de un haz de radiación convencional de onda continua.
- La Figura 7 muestra una realización de la invención que representa un proceso de clasificación que tiene múltiples boquillas.
- 10 La Figura 8 es un dibujo de una forma de realización de una clase flujo de la invención.
- La Figura 9 proporciona un diagrama ampliado que muestra diversas formas de realización de un montaje de múltiples boquillas.
- 15 La Figura 10 describe realizaciones de ciertos intervalos de tiempo y cantidades de energía de luz que pueden derivarse de las propiedades particulares de la luz pulsada.
- La Figura 11 es una comparación de un haz de radiación láser pulsada y un haz de radiación láser de onda continua.
- 20 La Figura 12 es una representación de una realización para una rutina de detección.
- La Figura 13 es una representación de una comparación de los datos agregados de diversos datos de los ensayos.
- 25 La Figura 14 proporciona histogramas y gráficos bivariantes de subpoblaciones que contienen al cromosoma X y que contienen al cromosoma Y de células espermáticas utilizando una forma de realización de una clase de flujo que no está de acuerdo con la invención que proporciona un haz de láser pulsado de 20 mW que incide en las células espermáticas analizadas.
- 30 La Figura 15 proporciona histogramas y gráficos bivariantes de subpoblaciones que contienen al cromosoma X y que contienen al cromosoma Y de células espermáticas utilizando una forma de realización de una clase de flujo que no está de acuerdo con la invención que proporciona un haz de láser pulsado de 60 mW que incide en las células espermáticas analizadas.
- 35 La Figura 16 proporciona histogramas y gráficos bivariantes de subpoblaciones que contienen al cromosoma X y que contienen al cromosoma Y de células espermáticas utilizando una forma de realización de una clase de flujo que no está de acuerdo con la invención que proporciona un haz de láser pulsado de 90 mW que incide en las células espermáticas analizadas.
- 40 La Figura 17 proporciona histogramas y gráficos bivariantes de subpoblaciones que contienen al cromosoma X y que contienen al cromosoma Y de células espermáticas utilizando una forma de realización de una clase de flujo que no está de acuerdo con la invención que proporciona un haz de láser pulsado de 130 mW que incide en las células espermáticas analizadas.
- 45 La Figura 18 proporciona histogramas y gráficos bivariantes de subpoblaciones que contienen al cromosoma X y que contienen al cromosoma Y de células espermáticas utilizando una forma de realización de una clase de flujo que no está de acuerdo con la invención que proporciona un haz de láser pulsado de 160 mW que incide en las células espermáticas analizadas.
- 50 La Figura 19 proporciona histogramas de las células espermáticas analizadas con una forma de realización de una clase de flujo de la invención comparado con un histograma de las células espermáticas de la misma muestra analizada con tecnología convencional de la clase de flujo de OC.
- V. Descripción detallada de las realizaciones preferidas
- 55 Como se mencionó anteriormente, la presente invención incluye una variedad de aspectos, que pueden combinarse de diferentes maneras. Las siguientes descripciones se proporcionan para enumerar elementos y describir algunas de las realizaciones de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones iniciales, sin embargo, debe entenderse que se pueden combinar de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los diferentes ejemplos descritos y formas de realización preferidas no deben interpretarse como limitantes de la presente invención solamente a los sistemas, técnicas y aplicaciones descritos explícitamente.
- 60
- Haciendo referencia principalmente a la Figura 1, la presente invención proporciona, en formas de realización, un emisor de radiación que se utiliza con sistemas de análisis de partículas. En algunas realizaciones de la invención, un emisor (12) de radiación o incluso un elemento de radiación interrumpido en forma intermitente pueden convertir la corriente eléctrica en fotones de radiación de una longitud de onda específica y pueden generar radiación o
- 65

incluso luz láser para el análisis de partículas biológicas o no biológicas. La radiación (11) puede entrar en una cámara o región (22) en la que puede ser modulada o incluso modificada, tal como, pero sin limitarse al establecimiento de una forma de onda coherente. La radiación puede ser modificada por un manipulador (21) del haz, tal como elementos ópticos antes de que pueda iluminar una partícula o incluso una(s) muestra(s) de partículas.

En algunas realizaciones, se pueden utilizar manipuladores (21) del haz, tales como elementos ópticos y se pueden situar a lo largo de una trayectoria de la luz. Los manipuladores del haz pueden incluir espejos, espejos ópticamente reflectantes o incluso refractantes, superficies que actúan parcialmente como espejos, deflectores, divisores de haz, objetos de refracción, lentes, filtros, prismas, lentes, o similares. Los manipuladores del haz pueden modificar o incluso modular una luz láser pulsada mediante enfoque, condensación, desenfoco, expansión, división, o similares. La radiación puede ser dividida en múltiples haces de intensidad igual o tal vez incluso desigual. Un manipulador del haz de radiación puede influir en un haz de radiación, tal como mediante la adaptación de un haz o cambiando un haz como según lo requiera una situación particular.

Con respecto a algunas realizaciones de la invención, los elementos (24) de control de posición pueden proporcionar un control posicional sobre un espejo, lente, prisma, filtro, u otros componentes ópticamente relevantes. Un elemento de control posicional puede influir en el ángulo de reflexión o incluso la refracción de un haz, y puede incluso dirigir en última instancia, una posición final de un haz de luz láser pulsado sobre una(s) partícula(s) o muestra(s) de partícula(s). Un elemento de control posicional puede ser un dispositivo mecánico que puede mover un espejo a lo largo de una trayectoria, o puede ser incluso un dispositivo dentado o incluso escalonado que puede proporcionar un gran número de ángulos predefinidos para un elemento óptico. Se puede(n) usar un elemento(s) (24) de control de posición en cualquier punto en un láser pulsado e incluso un montaje o aparato de luz pulsada para modificar un haz de luz láser pulsado. Un oscilador puede proporcionar una vibración constante en un elemento óptico y puede definir una frecuencia y amplitud.

A fin de permitir la división de la radiación en al menos dos haces de luz, la presente invención puede incluir un divisor de haz. Esto puede someter a las células espermáticas a una potencia de radiación más reducida que una potencia de radiación que fue emitida originalmente a partir de una fuente de láser como emisor de radiación. Los ejemplos de radiación reducida pueden incluir la división de un haz de radiación en un medio, en un cuarto de dicha potencia originalmente emitida o incluso en un octavo de la potencia originalmente emitida, como puede ser representado por la Figura 2. Por supuesto, hay muchas opciones para reducir la potencia y se pretende que todas estén incluidas dentro del alcance de esta descripción. Con un láser pulsado, para producir por ejemplo una salida de 1000 mW dividida en 8 haces iguales de aproximadamente 120 mW, puede ser posible tener 8 boquillas de citometría de flujo de clasificación juntas a partir de una fuente de luz.

En cuanto a otras formas de realización de la invención, los haces independientes de la luz láser pulsada pueden ser iguales o incluso pueden ser desiguales en intensidad. Los haces divididos se pueden derivar de un haz fuente de luz láser pulsada por la acción de divisores ópticos. Como se muestra en la Figura 2, un divisor (31) de haz tal como un prisma, puede dividir un haz de radiación en al menos dos haces de la misma frecuencia y velocidad de pulso, pero puede tener intensidades iguales o incluso desiguales. Los haces divididos de luz pueden tener intensidades que pueden ser cada uno menos intenso que, o incluso aditivamente cerca de un equivalente al haz original que entró en un divisor o prisma. Un divisor o prisma complejo del haz, que con geometrías tridimensionales de múltiples facetas, puede dividir un haz de luz láser pulsado en más de una, sin duda dos, posiblemente decenas o incluso cientos de haces independientes de luz láser pulsado.

Los divisores (34) complejos de haz pueden incluir una matriz empacada tridimensional de divisores simples o incluso prismas que puede crear geometrías tridimensionales combinadas de refracción y reflexión e incluso puede dividir un haz de radiación en más de uno, sin duda dos, posiblemente docenas o incluso cientos de haces independientes de luz láser pulsada. Esto puede diferir de un divisor complejo de haz en el que una serie de divisores simples e incluso prismas puede permitir geometrías individuales de cada componente, índice de refracción de cada componente, lo que puede permitir un número mucho mayor de opciones. Un divisor (35) de haz rotacional puede ser girado sobre un eje, potencialmente a velocidades muy altas, de tal manera que un número extremadamente grande de haces de luz láser pulsados pueda ser creado hasta el punto donde ya no se puede hablar de haces reales, sino más bien de cada pulso moviéndose en una dirección independiente, ligeramente diferente que el pulso anterior. Los divisores de haz o divisores ópticos se pueden usar en cualquier punto a lo largo del haz de luz láser pulsado.

Otro ejemplo de un manipulador (21) de haz puede incluir filtros que se puede colocar en una trayectoria del haz para modular o modificar una propiedad de una luz láser pulsada, y puede incluso reducir la energía neta de un haz particular. Se pueden utilizar un gran número de filtros en serie o incluso en paralelo a través de muchos haces diferentes de luz láser pulsada.

Un emisor (12) de radiación o incluso un emisor de radiación intermitentemente interrumpido pueden ser incorporados de manera integrada en un sistema de análisis de partículas o de separación de partículas. Alternativamente, con respecto a algunas realizaciones de la invención, una fuente láser pulsada puede ser independiente y divisores, como se describió anteriormente, pueden ser utilizados para dividir un haz original de luz

para proporcionar luz de iluminación para numerosos componentes de análisis de partículas que operan independientemente.

5 Se entiende que una unidad fundamental de iluminación puede ser un solo pulso de una luz láser, y que cada pulso o luz láser puede ser dividido en numerosas ocasiones. A través de la división, filtración o incluso ambos, una energía neta de cualquier pulso dado que ilumina un objeto biológico o muestra puede ser tal vez tan pequeño como un solo fotón de luz o tal vez tan grande como una energía de pulso original, emitida desde una unidad de láser.

10 También se entiende que el uso de divisores, que pueden dividir haces de luz láser en dos o más haces, puede aumentar el número de haces de luz que pueden iluminar partículas, tales como objetos biológicos. En formas de realización, una cierta cantidad de haces de luz pulsada por segundo que puede ser dirigida hacia las partículas se puede multiplicar con un divisor. También se entiende que los pulsos por segundo se pueden alterar con un número deseado de pulsos por segundo, temporización del pulso, e incluso la posición del pulso. Una luz pulsada puede ser distribuida por un aparato hasta posiblemente millones de partículas o muestra(s) de partículas que puede estar situadas en diferentes posiciones. Mediante el uso de oscilaciones armónicamente sincronizadas, rotaciones, e incluso geometrías, se pueden suministrar muchos pulsos por segundo a la misma partícula, muestra, o incluso objetos biológicos. Se entiende particularmente que, en formas de realización, se pueden establecer sistemas con eventos de iluminación recurrentes.

20 Una realización de la presente invención puede incluir un sistema conectado de manera fluida, tal como un sistema de citómetro de flujo, como se observa en la Figura 3. Esto puede ser representativo de un número múltiple de sistemas de citometría de flujo que están vinculados como un solo sistema.

25 Los emisores de radiación e incluso emisores de radiación intermitentemente interrumpido, como se describe en más detalle a continuación, pueden proporcionar uno, dos, tres o tal vez incluso más haces de radiación que tienen frecuencias, longitudes de onda, intensidades, e incluso vatios específicos para iluminar el tipo de partículas a analizar. Un emisor de radiación intermitentemente interrumpido puede multiplicar la radiación objetivo, por ejemplo, a células espermáticas durante un primer período de tiempo y puede multiplicar la radiación de terminación de las células espermáticas durante un segundo período de tiempo (41). Esto puede ser representado por la Figura 4.

30 En formas de realización, una primera cantidad de tiempo (40) puede incluir una cantidad de tiempo en que se produce la radiación y este tiempo puede estar entre aproximadamente 5 hasta aproximadamente 20 picosegundos. Una segunda cantidad de tiempo (41) puede ser una radiación fuera de tiempo y puede ser de entre aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 nanosegundos. Por supuesto, se pueden utilizar otras cantidades de tiempo tanto para una primera cantidad como para una segunda cantidad de tiempo y se entiende que todas están incluidas dentro del alcance de esta invención. Un ciclo de un primero y un segundo tiempo puede ser entendido como una repetición (42). Cada repetición puede incluir un tiempo de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 microsegundos, sin embargo, la repetición puede variar. En formas de realización, una velocidad de repetición puede incluir entre aproximadamente 50 hasta aproximadamente 200 MHz y puede incluso incluir una velocidad de hasta aproximadamente 80 MHz. Otras velocidades de repetición son posibles y se pretende que todas estén incluidas dentro del alcance de esta descripción. En formas de realización, un emisor de radiación puede ser un láser de Nd:YAG, Nd:YVO₄, o emisores de radiación similares.

45 La Figura 4 muestra los parámetros tomados en cuenta cuando se habla de las diferencias entre láseres de onda continua (OC) o incluso láseres de gas y pulsados o incluso láseres de estado sólido. Como se muestra en la Figura 4, un emisor (56) de radiación intermitentemente interrumpido puede emitir radiación que puede no ser continuo, sin embargo, estar en pulsos regulares cortos que pueden tener un tiempo de duración o una primera cantidad de tiempo (40). Después de un pulso, puede haber un período oscuro o una segunda cantidad de tiempo (41) en la que no se puede generar luz. El tiempo total transcurrido entre dos impulsos, una velocidad de repetición, puede ser por lo tanto el tiempo de duración además del período de oscuridad. Un ancho de línea de pulso y un período oscuro pueden ser similares en longitud, y puede ser postulado que un láser en realidad puede iluminar una muestra durante algo menos que "la mitad del tiempo". Alternativamente, un ancho de línea de pulso puede ser mucho más pequeño que un período de oscuridad, y por lo tanto una muestra puede ser iluminada por sólo una fracción muy pequeña del tiempo.

55 La energía (36) pico y una cantidad total de energía o julios suministrados a partir de un pulso de luz láser se representa en la Figura 5. Cantidades (37) fraccionarias de esa energía se pueden dividir como se describió más arriba o se puso a través de un filtro de densidad neutra. Es importante destacar que, se puede disminuir la cantidad de luz en un pulso usado para iluminar una partícula dividiendo o filtrando el haz. Por ejemplo, un haz de 350 mW se puede dividir en 10 haces iguales de aproximadamente 35 mW para correr 10 máquinas de análisis independientes a partir de una única fuente de láser. En la práctica, la calidad de los análisis a 35 mW debe permitir la información relacionada con las características de la partícula iluminada, y para aplicaciones comerciales tal vez ofrecen al menos la misma cantidad de información que con las partículas iluminadas con un láser UV de OC corriendo con el estándar de 150 mW. La Figura 5 puede ayudar además en la comprensión del diagrama de bloques representado en la figura 4. Cada pulso de radiación se puede reducir en energía como se discutió previamente.

5 Puede ser necesaria una densidad de energía o incluso vatios para alcanzar la emisión (38) de luz máxima de una partícula tras la iluminación como se muestra en la Figura 6. Se ha contemplado que la entrada de luz de un láser de onda continua, sin embargo, pueda ser tan baja que una partícula no pueda estar nunca completamente saturada con iluminación (43). Una luz (44) de emisión de partículas iluminadas por un láser de OC con una intensidad
10 energía dado puede ser constante, ya que la fuente de luz puede estar constantemente refrescando la partícula hasta un cierto valor parcial de saturación. En comparación, la luz (39) de emisión de la misma partícula que ha sido iluminada con pulsos puede ser mayor que a partir de un láser de OC. Los pulsos pueden ser cortos y pueden tener la intensidad de luz de iluminación muchos órdenes de magnitud mayor que el nivel de iluminación de un láser de OC. También se ha especulado que un destino de la emisión de luz de una partícula o muestra(s) de partículas durante el período oscuro puede depender de la vida media de emisión de la partícula iluminada e incluso puede depender de la longitud de tiempo del período de oscuridad. En el caso en que una vida media pueda ser tan larga o más larga que el período de oscuridad, la emisión podría permanecer cerca del máximo durante todo el tiempo a través de todos los pulsos suministrados a la muestra.

15 También debe señalarse que si en lugar de reducir la energía de entrada mediante la división o el filtrado, en vez de utilizar el movimiento de los espejos y reflectores, se puede reducir el número de pulsos suministrados a una muestra biológica a tan solo un pulso, al tiempo que conserva la intensidad muy fuerte del pulso. Por lo tanto, es un aspecto único de la invención proporcionar el movimiento del haz de láser pulsado con fuerza completa a través de una pluralidad de partículas que pueden por ejemplo ser arrastrado en una corriente de fluido que pasa a través de una boquilla de citometría de flujo situada en una matriz o arreglo (tal como un ADN o microarreglo de proteína), o una combinación de ambos, como sería el caso de un único láser que se hace oscilar para que ilumine un pequeño número de boquillas de citometría de flujo en las proximidades.

20 Con referencia ahora principalmente a la Figura 8, se pueden introducir células espermáticas que pueden ser irradiadas a través de un elemento (4) para la inyección de la muestra de esperma que puede actuar para suministrar células espermáticas que pueden ser irradiadas para análisis por citometría de flujo. Las células espermáticas que pueden ser irradiadas pueden ser depositadas dentro de una boquilla (5) de una manera tal que las partículas o células se introducen en un fluido (3) envolvente. Una boquilla puede estar ubicada en parte debajo de un punto de inyección de las células espermáticas. Se puede suministrar un fluido (3) envolvente por medio de una fuente (46) de fluido envolvente a través de un puerto (2) de fluido envolvente de modo que las células espermáticas que pueden ser irradiadas y el fluido envolvente puedan ser alimentados simultáneamente a través de una boquilla (5). Por consiguiente, la presente invención puede proporcionar el establecimiento de un fluido envolvente y hacer fluir un fluido envolvente en una boquilla, y la inyección de células espermáticas que pueden ser irradiadas en un fluido envolvente como se muestra en la Figura 8.

25 Además, en formas de realización, la presente invención puede incluir someter a radiación células espermáticas que pueden ser irradiadas. La radiación puede ser producida a partir de un emisor (12) de radiación como se discutió anteriormente. En formas de realización, el emisor de radiación puede ser un emisor de radiación intermitentemente interrumpido o incluso puede ser un láser de onda continua.

30 En formas de realización, la presente invención puede incluir multiplicar el sometimiento de las células espermáticas a la radiación que tiene una longitud de onda apropiada para activar la fluorescencia en una célula de esperma. La invención puede incluir una longitud de onda de activación de fluorescencia. Tal longitud de onda puede incluir alrededor de 355 nm. Por supuesto, esto puede incluir cualquier longitud de onda que pueda ser necesaria para activar la fluorescencia. Tales otras longitudes de onda pueden incluir 350 nm, 360 nm y otras longitudes de onda y se pretende que todas estén incluidas dentro del alcance de esta descripción.

35 En formas de realización, la presente invención incluye bombardear suficientemente el esperma con radiación para provocar que el esperma que puede ser irradiado emita fluorescencia. Esto puede incluir el suministro de radiación a cierta longitud de onda, potencia, energía y similares que sean suficientes para provocar que un esperma que puede ser irradiado emita fluorescencia.

40 En formas de realización, la presente invención permite la excitación de células espermáticas que pueden ser irradiadas que han sido sometidas a radiación. Cuando están en un estado excitado, las células emiten fluorescencia. En formas de realización, las células espermáticas que pueden ser irradiadas pueden ser excitadas en forma múltiple con radiación. Esto puede incluir la radiación que es emitida desde un emisor de radiación intermitentemente interrumpido.

45 Un pulso de luz láser puede iluminar partículas o incluso una muestra(s) de partículas en un lugar específico, con una frecuencia de REM o Hertz, sincronizada como un reloj, intensidad o incluso vatios, e incluso energía neta o julios. Las partículas pueden absorber la luz pulsada, pueden excitarse e incluso pueden emitir luz de la misma frecuencia que la de la luz láser pulsada, tal como una dispersión o incluso pueden emitir una luz de una frecuencia diferente o incluso fluorescencia. La naturaleza exacta de la cantidad de energía absorbida por una partícula puede estar relacionada con las propiedades químicas de la partícula, las propiedades químicas de cualquiera de los objetos unidos o estrechamente asociados con las partículas, las propiedades físicoquímicas del entorno de la partícula, tales como segregaciones biológicas incluyendo membranas, orgánulos, solutos, pH, temperatura,

50
55
60
65

- osmolaridad, carácter coloidal, o similares, e incluso puede estar relacionada con la frecuencia y la intensidad de la luz láser que ilumina la partícula. Una emisión de luz de REM de una partícula, que se caracteriza por una longitud de onda y cantidad, puede proporcionar información muy precisa sobre el estado de una partícula cuando incide un pulso de luz de iluminación. Dependiendo de la naturaleza de la partícula y del ambiente de la partícula, la partícula puede entonces emitir una señal de luz fluorescente, y puede hacerlo durante un cierto período de tiempo definido por una vida media de emisión. Por lo general, una serie de pulsos de luz láser puede iluminar una partícula o muestra de partículas en un período de tiempo especificado, y puede haber una emisión correspondiente que cambia en forma dinámica de luz en el mismo período, o en un período de tiempo después de la iluminación.
- 5
- 10 Fluorescencia emitida por cada una de las células espermáticas se puede detectar con un sistema (23) de detección. Un sistema de detección puede incluir un detector (7) de fluorescencia que puede ser conectado a una unidad (15) de procesamiento. Mientras se procesa la fluorescencia emitida, la presente invención puede incluir la evaluación de las señales emitidas. La evaluación de la fluorescencia emitida puede incluir la cantidad de fluorescencia que puede ser emitida posiblemente por comparación entre las células o incluso puede posiblemente ser comparada con una cantidad predeterminada. La presente invención puede incluir, en formas de realización, la selección de una condición eléctrica que está asociada con cada una de las células espermáticas en un flujo de fluido envolvente. Una condición eléctrica puede ser una carga, voltaje o cualquier condición eléctrica. Un circuito (8) de caída de carga puede cargar una corriente de células y al fluido envolvente con base en las propiedades deducidas de cada una de las células excitadas. Por ejemplo, esto puede ser para cargar todas las células espermáticas que contienen al cromosoma X con una carga positiva, y cargar todas las células espermáticas que contienen al cromosoma Y con una carga negativa. Por supuesto, aunque la descripción se centra principalmente en las células espermáticas, otras partículas pueden ser analizadas como se discute en las diversas realizaciones descritas.
- 15
- 20
- 25 Se puede formar y aislar una gota cargada en una zona de caída libre. Una gota puede basarse en si existe o no una célula deseada dentro de esa gota. De esta forma, el sistema de detección puede actuar para permitir que una primera y una segunda placas (18) de deflexión desvíen las gotas en función de si contienen o no la célula apropiada u otro elemento. Las placas de deflexión pueden estar dispuestas en lados opuestos de una zona de caída libre en la que se puede formar una gota y las placas de deflexión pueden ser cargadas de forma opuesta.
- 30
- 35 Como resultado, un citómetro de flujo puede actuar para clasificar células haciendo que ellas aterricen en uno o más colectores. En consecuencia, mediante la detección de alguna propiedad de las células u otros elementos, un citómetro de flujo puede discriminar entre las células con base en una característica particular y colocarlas en el colector apropiado. En algunas realizaciones, las gotitas de esperma que contienen al cromosoma X están cargadas positivamente y se desvían en una dirección, y las gotitas de esperma que contienen al cromosoma Y están cargadas negativamente y se desvían hacia otro lado. Una corriente desperdiciada que pueden ser de células que no pueden ser clasificadas puede ser descargada y puede ser recogida en un colector, una corriente no desviada en un tubo de succión o similar.
- 40
- 45 De esta manera, un fluido envolvente puede formar un ambiente fluido envolvente para que las células espermáticas sean analizadas. Ya que los diversos fluidos entran al citómetro de flujo con alguna presión, pueden fluir fuera de la boquilla (5) y salir a través de un orificio (47) de la boquilla. Al proporcionar algún tipo de oscilador (6) que puede ser controlado de forma muy precisa a través de un control (45) de oscilador, se pueden establecer ondas de presión dentro de la boquilla y transmitidas a los fluidos que salen de la boquilla en el orificio de la boquilla. Ya que un oscilador puede actuar sobre el fluido envolvente, una corriente (19) que sale del orificio (47) de la boquilla puede eventualmente y regularmente formar gotas (9). Debido a que las partículas o células están rodeadas por la corriente de fluido o ambiente del fluido envolvente, las gotas (9) pueden arrastrarse dentro de las partículas o células aisladas individualmente, tales como células espermáticas con respecto a algunas realizaciones de la invención.
- 50
- 55 Ya que las gotas pueden arrastrar partículas o células, el citómetro de flujo se puede utilizar para separar las células espermáticas con base en las características de las partículas o de las células. Esto se logra a través de un sistema (23) de detección de partículas o de células. El sistema de detección de partículas o de células implica al menos algún tipo de detector (7) que responde a las células contenidas dentro de la corriente de fluido. El sistema de detección de células puede causar una acción dependiendo de la presencia o ausencia relativa de una característica, tal como un fluorocromo unido a la célula o al ADN dentro de la célula que puede ser excitado mediante una fuente de irradiación, tal como un emisor (12) de radiación que genera un haz de irradiación al que puede ser sensible la partícula. Aunque cada tipo de célula, o el ADN nuclear de células espermáticas puede ser teñido con al menos un tipo de fluorocromo, cantidades diferentes de fluorocromo se unen a cada partícula individual o célula con base en el número de sitios de unión disponibles para el tipo particular de fluorocromo utilizado. Con respecto a los espermatozoides, la disponibilidad de sitios de unión para el colorante Hoechst 33342 depende de la cantidad de ADN contenido dentro de cada espermatozoide. Ya que los espermatozoides que contienen al cromosoma X contienen más ADN que los espermatozoides que contienen al cromosoma Y, los espermatozoides que contienen al cromosoma X pueden enlazar una mayor cantidad de fluorocromo que los espermatozoides que contienen al cromosoma Y. Por lo tanto, mediante la medición de la fluorescencia emitida por el fluorocromo unido tras la excitación, es posible diferenciar entre los espermatozoides que contienen al cromosoma X y los espermatozoides que contienen al cromosoma Y.
- 60
- 65

- 5 Como resultado, el citómetro de flujo actúa para separar las células haciendo que se dirijan a uno o más recipientes de recolección. Por ejemplo, cuando el analizador diferencia a las células espermáticas con base en una característica de las células espermáticas, las gotitas que arrastran espermatozoides que contienen al cromosoma X pueden ser cargadas positivamente y por tanto se desvían en una dirección, mientras que las gotitas que arrastran espermatozoides que contienen al cromosoma Y pueden ser cargados negativamente y, por tanto desviarse hacia el otro lado, y la corriente desperdiciada (es decir las gotitas que no arrastran una partícula o célula o que arrastran las células no deseadas o que no pueden ser clasificadas) pueden permanecer sin carga y por lo tanto se recoge en una corriente no desviada en un tubo de succión o similar como se discute en la patente de los Estados Unidos No. 6.149.867 de Seidel. Naturalmente, se pueden establecer numerosas trayectorias de desviación y se recolectan simultáneamente.
- 10 Las células de la muestra que puede ser irradiada pueden incluir una celda de la muestra que es capaz de emitir rayos de luz después de la iluminación.
- 15 La luz láser que incide sobre la(s) partícula(s) que se analiza puede generar al menos uno, o incluso dos, tres o más haces de luz difusa o luz emitida que tienen frecuencias, longitudes de onda, intensidades y tal vez incluso vatios específicos. Toda o una porción de la luz dispersada o incluso de la luz emitida puede ser capturada por un detector. Un detector puede incluir un tubo fotomultiplicador o detectores similares.
- 20 Un sistema de detección puede ser utilizado para detectar una cantidad de fluorescencia emitida por cada una de las células espermáticas en un sistema de citometría de flujo. Un sistema de detección o incluso un detector de fluorescencia de células espermáticas puede incluir un tubo fotomultiplicador. En otras formas de realización, un sistema de detección puede incluir un montaje óptico de lentes, un tubo fotomultiplicador e incluso algún tipo de sistema de análisis tal como un ordenador. Un montaje óptico de lentes puede recolectar fluorescencia emitida y transportar una señal recolectada a un tubo fotomultiplicador. La señal detectada por un tubo fotomultiplicador puede ser luego analizada por un ordenador o dispositivos similares.
- 25 Un solo detector o incluso quizás un detector(es) digital(es) o análogo(s) múltiple(s) puede(n) recibir la totalidad o incluso una porción de la luz dispersa o la luz de emisión. El(los) procesador(es) análogo(s) o digital(es) puede(n) convertir las señales detectadas por el detector(s) en una corriente análoga o incluso en información digital. La información puede representar con precisión la identidad, frecuencia, cantidad, e incluso julios de luz o REM recibida por el detector.
- 30 En formas de realización, un detector puede generar una señal de corriente o digital correspondiente a la cantidad de cuantos de luz que bombardean al detector. Ciertas formas de realización de la invención, pueden proporcionar un detector dimensional que suma toda la luz de la longitud de onda especificada incidente sobre la superficie del detector durante un período de tiempo especificado. La duración o incluso un tiempo total de detección puede ser tan simple como una recolección aditiva total o incluso integración sobre un tiempo de análisis completo de la muestra, o puede ser un conjunto dinámico de datos que puede registrar una emisión de luz de un objeto(s) biológico(s) o muestra(s) durante un período de tiempo. Ese período de tiempo puede ser tan corto como el tiempo entre dos impulsos de la luz láser pulsada, o puede ser tan largo como muchos millones de pulsos. Se entiende que un detector de este tipo puede volverse bidimensional cuando se considera la segunda dimensión del tiempo.
- 35 En otras realizaciones, un detector bi o tridimensional puede comprender un panel plano, una matriz tridimensional de células unitarias o incluso píxeles que pueden detectar una luz de emisión una vez o más veces y puede registrar o reportar la interacción específica con esa célula unitaria individual. La información relevante para el operador de un aparato puede ser una suma o la visualización de los resultados de muchas células unitarias. Este tipo de detector puede incluir, pero no se limita a, película fotográfica, papel fotográfico, o incluso un microchip capaz de enviar datos para la formación de imágenes en una pantalla de televisión o pantalla del ordenador. Se entiende que un detector bidimensional puede convertirse en uno tridimensional, y un detector tridimensional puede convertirse en dimensional cuando la dimensión de tiempo adicional puede ser considerada.
- 40 Una señal generada por un detector puede ser procesada para proporcionar resultados simples, tales como fotos. Una señal generada por un detector puede incluso ser capaz de permitir el análisis de muchos miles o incluso millones de objetos biológicos en tiempo real con gráficos de ordenador que pueden producir representaciones para permitirle a un usuario modular o modificar un proceso de análisis en tiempo real. En otras realizaciones, puede ser deseable hacer una clasificación con una detección magnética.
- 45 En formas de realización, la presente invención puede incluir detectar cuantitativamente una cantidad de fluorescencia emitida por cada una de las células espermáticas. La cantidad de la fluorescencia emitida puede ser detectada con un detector cuantitativo de fluorescencia de células espermáticas. Por supuesto, esto puede incluir otras muestras. En las células espermáticas, se puede distinguir un esperma que contiene al cromosoma X y un esperma que contiene al cromosoma Y porque un esperma que contiene al cromosoma X puede emitir una cantidad diferente de fluorescencia que un esperma que contiene al cromosoma Y. En otras formas de realización, si se usan otras muestras además de células espermáticas, la presente invención puede permitir distinguir entre una primera población de partículas y una segunda población de partículas debido a la diferencia en la cantidad de fluorescencia
- 50
55
60
65

emitida desde cada población de partículas. Un análisis distintivo puede ser calculado con un detector.

5 El(Los) ordenador(es) controlado(s) por el sistema operativo o incluso los ordenadores controlados por una interfaz gráfica de usuario pueden usar los datos de un procesador(es) analógico(s) o incluso digital(es). Un ordenador puede facilitar el control de retroalimentación directa de un láser e incluso de un equipo analítico. Un ordenador puede incluso proporcionar datos para apoyar una estación de trabajo que pueden darle a un operador(es) de un equipo analítico o de separación imágenes que pueden relacionarse con el comportamiento del sistema. Esto puede permitir el control del comportamiento del sistema para un análisis óptimo, cuantificación, e incluso separación de un objeto(s) biológico(s) o incluso de una(s) muestra(s).

10 Un equipo de comando computacional auxiliar o incluso un equipo de control pueden permitir el control mediante una red local de aparatos de análisis, cuantificación y separación. El equipo de control puede comunicarse en redes de área local (LAN) o incluso redes de área amplia (WAN) para permitirles a los operadores locales o tal vez incluso distantes la capacidad de iniciar, supervisar, controlar, localizar averías, descargar datos o incluso instrucciones, datos de carga o instrucciones, terminar, y similares. El equipo de control puede permitir la operación de uno, dos, tres o incluso más aparatos.

15 Los subcomponentes computacionales pueden corresponder a un comando e incluso a un control que puede ser integrado en un diseño y construcción de un láser pulsado. En algunas realizaciones, los subcomponentes computacionales pueden ser partes independientes, o incluso integradas de un aparato y pueden residir fuera de una carcasa de un láser pulsado.

20 En formas de realización, la presente invención permite la coloración de una célula de esperma con un colorante fluorescente. Una célula de esperma teñida con fluorocromo que es el fluorocromo H33342 de bisbenzimidazoles de Hoechst.

25 En algunos casos, se puede usar una gran cantidad de colorante para teñir una célula de esperma. Las células espermáticas contienen ácido desoxirribonucleico y el ácido desoxirribonucleico puede tener muchos sitios de unión con los cuales pueden enlazarse las moléculas de colorante. Debido a la naturaleza de las células espermáticas, una célula de esperma teñida puede tener adheridas muchas moléculas de un colorante en cada sitio de enlazamiento de un esperma.

30 En formas de realización, la presente invención puede incluir la coloración de una muestra de esperma durante un tiempo de coloración reducido. El tiempo de coloración puede variar debido al tipo de colorante utilizado e incluso debido al tipo de muestra utilizada, en este caso esperma. Normalmente, la coloración del esperma con Hoechst 33324 puede tomar unos 40 minutos, permaneciendo otras condiciones constantes. Algunos ejemplos de un tiempo de coloración reducido pueden incluir los siguientes:

- 35 - aproximadamente menos de 40 minutos.
- 40 - aproximadamente menos de 35 minutos;
- aproximadamente menos de 30 minutos;
- aproximadamente menos de 25 minutos;
- aproximadamente menos de 20 minutos;
- 45 - aproximadamente menos de 15 minutos;
- aproximadamente menos de 10 minutos; y
- aproximadamente menos de 5 minutos.

50 Por supuesto, son ciertamente posibles otros tiempos de coloración y todos deben entenderse como representados dentro del alcance de esta invención.

55 En formas de realización, la presente invención permite distinguir entre un esperma que contiene al cromosoma X y un esperma que contiene al cromosoma Y en un sistema de citómetro de flujo. Un esperma que contiene al cromosoma X puede emitir una fluorescencia diferente de dicho cromosoma Y. Por ejemplo, un esperma que contiene al cromosoma X puede contener más ADN que un esperma que contiene al cromosoma Y, por lo tanto, un esperma que contiene al cromosoma X puede unirse a más colorante. Cuando se ilumina, un esperma que contiene al cromosoma X puede emitir una fluorescencia mayor que un esperma que contiene al cromosoma Y. La diferencia puede proporcionar la capacidad para distinguir los dos espermias que contienen al cromosoma.

60 La presente invención puede incluir, en formas de realización, células espermáticas con una coloración mínima con el colorante fluorescente anterior. Una coloración mínima del esperma puede incluir permitir que menos colorante se una a cada esperma. Por ejemplo, puede requerirse cierta cantidad de colorante para completar la unión de las moléculas de colorante con cada sitio de unión de una célula de esperma. Puede ser una opción eficiente si se puede utilizar menos cantidad de colorante mientras se mantiene la capacidad de lograr un resultado deseado, tal como la capacidad de distinguir entre dos células diferentes después de la radiación. En formas de realización, la presente invención puede incluir proporcionar un porcentaje de colorante. Aunque un porcentaje de colorante puede ser tan bajo como el 10%, otros ejemplos pueden incluir aproximadamente el 90%, aproximadamente el 80%,

aproximadamente el 70% y aproximadamente el 60%. Todos los porcentajes de colorante se entiende que están incluidos dentro del alcance de esta descripción.

5 Un beneficio con respecto a la clasificación de las células espermáticas utilizando un láser pulsado puede ser una
 10 reducción en la cantidad de colorante absorbido por las células espermáticas durante la coloración. Debido a que los
 tintes o colorantes, tales como Hoechst 33342, se unen con el ADN dentro de las células espermáticas, la coloración
 ha sido considerada un factor perjudicial para la viabilidad o la fertilidad de las células espermáticas. Usando la
 invención para clasificación del flujo mediante un láser pulsado, se puede reducir la cantidad de colorante absorbido
 por las células espermáticas durante la coloración en un 20% con respecto a las cantidades utilizadas con la
 tecnología convencional de clasificación de células con láser de OC con una resolución similar o mejor de las
 subpoblaciones que contienen al cromosoma X y al cromosoma Y. En ciertas muestras de células espermáticas, la
 cantidad de colorante absorbido por las células espermáticas se puede reducir hasta un mínimo del 60% de la
 cantidad utilizada con las mismas células clasificadas por tecnología convencional de clasificación de células por
 OC.

15 Una muestra utilizada en un sistema de citometría de flujo incluye células espermáticas. Una célula que puede ser
 utilizada puede ser una célula que puede ser usada para un procesamiento o análisis adicional después de
 finalización a través de un sistema de citometría. Las células haploides pueden incluir aquellas células que tienen un
 solo juego de cromosomas, tal como las células espermáticas. Una muestra delicada tal como una célula de
 20 esperma puede ser frágil o incluso puede ser fácilmente dañada, tal como la reducción de la viabilidad. Una muestra
 delicada puede haber aumentado su sensibilidad a ciertos entornos tales como el tipo de colorante, el proceso de
 clasificación y otros entornos.

25 Las partículas pueden incluir los sitios de enlazamiento individuales o sitios de unión de una molécula en la
 superficie de una célula u otra molécula; moléculas grandes (posiblemente ya sea en la superficie de una célula o
 dentro de una célula), tales como proteínas, ADN monocatenario, ADN bicatenario, ARNm, ARNt, dúplex de ADN-
 ARN, estructuras combinadas de ácido nucleico - proteína tales como ribosomas, telomerasas, ADN o ARN
 polimerasas, aminoácido sintetasa; el sitio activo de una enzima tal como luciferasa, peroxidasa, deshidrogenasa o
 30 incluso citocromo oxidasa que pueden requerir cofactores tales como ATP, NADH o NADPH; hidruro libre o enlazado
 (H-).

En otra forma de realización que puede contribuir a la eficiencia en un sistema de citometría de flujo, la presente
 invención puede incluir someter las células espermáticas a radiación de baja potencia. Aunque el rango de potencia
 que puede ser utilizado con un sistema de citometría de flujo puede variar, algunas posibilidades de baja potencia
 35 puede incluir:

- menos de 300 milivatios;
- menos de 350 milivatios;
- menos de 200 milivatios;
- 40 - menos de 175 milivatios;

Una vez más, otras potencias de radiación son ciertamente posibles y todas deben entenderse como representadas
 dentro del alcance de esta invención, de acuerdo con la reivindicación 1.

45 En algunos ejemplos, se puede usar un láser Vanguard. El láser Vanguard es fabricado por Spectra-Physics y puede
 emitir 80 millones de pulsos por segundo (80 MHz). LaserForefront, Spectra-Physics, No. 30 (2001). Cada pulso
 puede tener un ancho de línea de alrededor de 12 picosegundos, y una velocidad de repetición de aproximadamente
 10 nanosegundos. Esto puede significar que para una aproximación, durante una sola repetición de 10
 nanosegundos, el láser pulsado puede iluminar un objetivo durante unos 12 de 10.000 picosegundos o
 50 aproximadamente 0,12% del tiempo total. En otras palabras, una muestra que está siendo iluminada por un láser
 pulsado puede pasar aproximadamente 99,88% del tiempo en la oscuridad. Esto también puede significar que ya
 que un láser pulsado puede suministrar 350 milivatios (mW) de potencia total, durante el breve pulso de 12
 picosegundos, un promedio de 280 vatios pueden ser suministrados a una partícula. Esto puede ser 800 veces más
 intenso que una luz de un láser de onda continua (OC) operando a 350 mW. Ya que una clasificación confiable del
 55 esperma se puede realizar a 150 mW en un láser UV estándar de OC, que puede representar un factor de 653
 veces, podría plantearse la hipótesis de que puede ser posible operar un láser pulsado a un valor tan bajo como
 150/650 o 0,23 mW y aún así tener suficiente intensidad de luz para iluminar un esperma.

60 En formas de realización, la presente invención incluye la utilización de al menos un recurso compartido para
 procesar las células espermáticas. Esto puede ayudar en la eficiencia de la clasificación del esperma en sistemas de
 citometría de flujo. Un recurso compartido puede incluir un sistema informático, un fluido envolvente, un dispositivo
 de boquilla múltiple integrado. En formas de realización, un recurso compartido incluye la utilización de una fuente
 de radiación. La radiación puede ser dividida en al menos dos haces y cada haz puede ser dirigido hacia una
 boquilla y la muestra es clasificada. En formas de realización, la presente invención puede incluir un emisor de
 65 radiación y un divisor de haz o incluso puede incluir un emisor de radiación intermitentemente interrumpido y un
 divisor de haz. Un divisor de haz puede ser cualquier tipo de divisor de haz como se discutió previamente.

5 Como se mencionó anteriormente, el uso de divisores refractivos o semi-reflectantes proporciona múltiples haces de luz láser pulsada derivada de la luz de la fuente original. Estos haces pueden tener menor intensidad que el haz original, pero pueden ser capaces de ser utilizado cada uno para analizar partículas separadas o una muestra(s) de partículas. Como también se discutió anteriormente, cada haz puede ser dedicado a un dispositivo analítico independiente o analítico /de separación (por ejemplo, pero no limitado a, un citómetro de flujo para clasificación de esperma o clasificador de células). En algunas realizaciones de la invención, cada haz de luz correspondiente a un instrumento independiente se puede dividir en dos haces de luz de la misma intensidad y se puede hacer incidir un haz de luz sobre la partícula a ser analizada, y el otro haz de luz puede proporcionar un haz de referencia. Mediante la comparación de los dos haces, se puede medir la absorción de luz de la fuente por la partícula. Otro atributo único e importante de la utilización de un único láser pulsado para suministrar luz a decenas o cientos o miles de análisis independientes o máquinas de separación puede ser que todo el complejo de instrumentos servidos por la única luz utilizará la misma luz, y en la medida en que todas las máquinas están realizando actividades idénticas o muy similares, es posible utilizar los datos de todas las máquinas como referencias internas y estándares entre sí, y mediante el uso de ordenadores o ambos que puede tener acceso local (LAN), así como distante (WAN) a los datos, para permitir que los operadores o personas a una distancia controlen el desempeño de cada máquina en tiempo real.

20 Aunque múltiples boquillas pueden estar integradas en un solo dispositivo, citómetros de flujo separados que tienen sólo una boquilla pueden estar alineada de manera que la radiación pueda ser dirigida a, o incluso dividida entre cada boquilla.

25 La presente invención incluye el flujo de al menos un fluido envolvente y células espermáticas en al menos dos boquillas. Multiplicando el número de boquillas que operan en un solo citómetro de flujo, se puede aumentar la cantidad (número de partículas) analizada y clasificada por unidad de tiempo. En el caso en que la operación del citómetro de flujo pueda estar en un entorno de producción que representa un producto vendible, múltiples boquillas pueden aumentar el número de unidades producidas en un solo turno por un solo operador, y por lo tanto una reducción en los costes de cada unidad producida.

30 Al operar un número de boquillas en el mismo dispositivo, una instrumentación de control utilizada en el citómetro de flujo y los operadores del citómetro de flujo pueden utilizar análisis estadístico del desempeño (datos de operación) de una multiplicidad de boquillas y pueden utilizar estos datos para el control por retroalimentación de boquillas individuales dentro de la población de las boquillas que se utilizan. Al operar una cierta cantidad de boquillas en el mismo dispositivo, una sola fuente de luz que proporciona una multiplicidad de haces (uno o más por cada boquilla) puede residir en el mismo montaje al igual que las boquillas y con ello reducir las complejidades de las trayectorias de la luz relacionadas con las boquillas que operan en montajes individuales, que pueden ser independientes del montaje de la fuente de iluminación primaria. Al operar una serie de boquillas en el mismo dispositivo iluminado por múltiples haces a partir de una única fuente de luz, la provisión de capital, operación, partes, servicio, y los costes de mantenimiento de un solo láser se pueden distribuir a través de una multiplicidad de boquillas de clasificación productivas, y, por lo tanto, se reducen los costos por unidad producida que se asignan a la operación del láser.

40 La Figura 7 muestra múltiples boquillas (5) que puede proporcionar gotas (9) cargadas. Las múltiples boquillas y colector (20) pueden estar dispuestos de manera que un número seleccionado de contenedores pueden ser menos que el número de boquillas. Los contenedores seleccionados pueden incluir recipientes que recolectan un tipo específico de célula, tal como todas las células espermáticas que contienen el cromosoma X. En esta figura, las células espermáticas clasificadas con el cromosoma X pueden ser representadas por los contenedores (32). Aquí hay tres contenedores seleccionados de una célula seleccionada que han sido clasificados a partir de cuatro boquillas.

50 En otras realizaciones, la presente invención prevé la utilización del esperma clasificado recolectado para inseminación de mamíferos hembra e incluso puede proporcionar un mamífero producido mediante el uso de células espermáticas clasificadas producidas con un sistema de citómetro de flujo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones tal como se presenta en esta descripción.

55 En otras realizaciones, la presente invención puede incluir controlar individualmente o incluso controlar de manera combinada al menos dos boquillas. Cada boquilla puede ser ajustada individualmente de acuerdo con una función deseada con un control de boquilla individual, o se pueden ajustar una pluralidad de boquillas de manera combinada con un único dispositivo de control de la boquilla que puede ser conectado a cada una de las boquillas.

60 En otra forma de aumentar la eficiencia en un sistema de citometría de flujo, la presente invención incluye clasificar rápidamente dichas células espermáticas. Esto se puede conseguir con un clasificador rápido de esperma o incluso un clasificador rápido de muestras de partículas. El esperma puede ser clasificado a cualquier velocidad. Tales posibilidades para una velocidad de clasificación pueden ser:

- 65 - superior a 500 células por segundo;
- superior a 1000 células por segundo;
- superior a 1500 células por segundo;

- superior a 2000 células por segundo; y
- superior a 3000 células por segundo.

5 Otras velocidades de clasificación son ciertamente posibles y todas deben entenderse como representadas dentro del alcance de esta invención.

10 En formas de realización, la presente invención puede incluir un colector de muestras de partículas tal como un colector de células espermáticas. Un colector puede tener múltiples contenedores, un colector combinado que tiene un contenedor individual, o cualquier tipo de colector. Por ejemplo, y como se muestra en la figura 9, un colector (63) combinado puede incluir un colector (32) para un tipo de partícula, tal como poblaciones de esperma que contienen el cromosoma X, un contenedor para un segundo tipo de partícula (33) tal como poblaciones de esperma que contienen el cromosoma Y, y puede incluso tener un tercer contenedor (64) para recoger aquellas gotas que pueden no haber sido cargadas.

15 Puede ser importante en el diseño de haces de iluminación considerar que cuanto más cerca está puede estar la fuente de iluminación (láser) al punto de análisis, menor efecto puede tener cualquier forma de movimiento, tal como vibraciones, sobre la trayectoria del haz. Puede ser deseable proporcionar un sistema que reduce la distancia entre y la ubicación de todas las boquillas dentro de una distancia muy pequeña una de la otra (por ejemplo, todas dentro de un espacio de 15 cm), y simplifica en gran medida y permite el uso de múltiples haces a partir de una única fuente de luz láser.

20 La Figura 9 muestra un diagrama de despiece de los componentes de un sistema de citometría de flujo combinado en una construcción paralela donde se pueden operar una multiplicidad de boquillas en un solo aparato. Aunque el diagrama representa seis boquillas, es un ejemplo, de tal manera que podría fácilmente tener sólo 2 o 3 boquillas, o puede tener tantas como 8 o 10 o 12 o incluso 24 boquillas una al lado de la otra.

25 Una multiplicidad de haces láser entrantes o de radiación (11), que en la mayoría de realizaciones podrían ser haces iguales derivados por la división de un haz fuente original que se encuentra localizado cerca de las boquillas, brilla sobre un punto de análisis que se define por la intersección del haz o la radiación (11) con una corriente estrecha de fluido que se emite desde la boquilla (5). En algunas realizaciones, el punto de análisis puede estar en el punto (60) focal de un plato (61) parabólico reflectante que puede reflejar la luz (62) emitida hasta la superficie (58) de detección. La luz láser no absorbida que no puede ser absorbida, puede ser absorbida por un disipador de calor, o puede ser medida por un detector adicional para determinar una intensidad exacta en tiempo real del haz. Cada boquilla puede estar equipada con un oscilador (6) que puede proporcionar una fuerza que causa que la corriente emitida desde la punta de la boquilla u orificio (47) se rompa en gotitas a frecuencias definidas, tal como en el intervalo de 10.000-100.000 Hz. Las gotitas pueden ser cargadas, y por la acción de un campo magnético se pueden separar. En el caso de clasificación del esperma de un mamífero vivo por la presencia de cromosomas X o Y, puede haber 3 corrientes de gotitas: una corriente que contiene principalmente esperma que contiene el cromosoma X, que puede por ejemplo ser recogida en un contenedor (32) en un lado de un colector (20), una corriente que contiene principalmente esperma que contiene al cromosoma Y, que puede por ejemplo ser recogida en otro contenedor (33) en el otro lado de un colector (20), y una corriente que contiene esperma que puede estar muerto y que puede ser recogida en un tercer contenedor (64) en el medio de un colector (20). En otras formas de realización, características tales como una superficie (58) de detección, platos (61) parabólicos, colectores (20) y en algunas realizaciones boquillas (5) y oscilador(es) (6), pueden ser fabricados con partes individuales o submontajes de grupo, que se puede intercalar juntos para poner de manifiesto la arquitectura real de la boquilla de clasificación.

30 En otras formas de realización de la presente invención, las superficies de detección pueden tener diámetros (57) similares al diámetro de pozos de una placa de microtitulación, que pueden ser de aproximadamente 5-8 milímetros, y pueden tener distancias (59) entre dos puntas vecinas de boquilla de citometría de flujo que son iguales a la distancia entre dos pozos, que puede ser de aproximadamente 12-18 mm.

35 Ahora, con referencia principalmente a la figura 10, se muestran ciertos intervalos de tiempo y las cantidades de energía de luz que pueden derivarse de las propiedades particulares de la luz proporcionada por un láser pulsado. Los láseres estándar utilizados en la mayor parte de la citometría de flujo y en particular en la clasificación de esperma han sido láseres de onda continua (OC) de tubo de iones que emiten un flujo de luz bastante constante; los láseres pulsados pueden ofrecer la misma velocidad de luz neta. Por ejemplo, como vatios se define como julios por segundo, podemos considerar el periodo de 1 segundo. Puede servir de ejemplo que para muchas aplicaciones en citometría de flujo, se pueden analizar tantos como 10.000-100.000 eventos individuales en 1 segundo, de modo que cada evento requiere energías de iluminación de aproximadamente 1/10.000-1/100.000 julios.

40 En contraste, el láser pulsado puede emitir la misma luz neta en pulsos regulares. En la figura 15, que representa un eje de tiempo arbitrario, cada pulso de luz (68) láser puede emitir una cierta energía, y tienen una cierta duración el pulso de iluminación. Cuando un pulso puede iluminar una partícula, puede ocurrir un pulso de emisión fluorescente a partir de esa partícula que puede ser representado por una curva (65) de emisión. Una curva de emisión puede representar una función clásica de decaimiento exponencial, donde la emisión máxima está al inicio y la velocidad de emisión (decaimiento) está a lo largo de una curva correspondiente de vida media. Con base en alguna definición

de decaimiento final, por ejemplo, para el punto en que la emisión es 1/1000 de la emisión original, o alrededor de 10 vidas medias, se puede establecer una duración (67) del pulso de emisión. También puede haber un período que comienza desde el punto final del decaimiento que ocurre al final del tiempo sumado correspondiente a la duración del pulso de iluminación y la duración (67) del pulso de emisión y el comienzo del siguiente pulso de iluminación, que puede ser definido como el período de pausa. La suma total de estos períodos constituye el período entre pulsos que puede ser el período entre pulsos y es típicamente el inverso de la frecuencia del láser.

Usando una superficie de detección, puede ser posible analizar la salida de luz emitida desde un pulso de emisión de una partícula y midiendo específicamente el total sumado de energía a partir del pulso de emisión, que puede ser una integración de la zona (66) bajo la curva (65) de decaimiento. Esta medición (70) puede ser almacenada como una carga eléctrica analógica en un dispositivo de almacenamiento de carga tal como un condensador apropiado, o puede ser convertida a un valor (70) digital que puede ser almacenado en un dispositivo de memoria digital. Dado que el pulso de emisión se produce como un evento de emisión dinámico, que a través de un sistema de fotodiodo/amplificador puede ser traducido en tiempo real en una corriente eléctrica (o diferencial de voltaje), las mediciones de corriente o de voltaje en múltiples puntos durante la emisión de la partícula pueden permitir determinar la derivada de la curva (71) de decaimiento. Estos pueden ser valores útiles en el análisis estadístico de múltiples eventos de iluminación idénticos de la misma partícula.

En citometría de flujo, que es un campo amplio en el que puede utilizarse la presente invención, las partículas que están siendo iluminadas por un láser están fluyendo comúnmente en una corriente de fluido o una celda de flujo más allá de un punto fijo después del cual se enfoca un haz de láser. En la figura 11, una velocidad de flujo de partículas allá del punto de iluminación puede ser una función del flujo de volumen de la corriente, y la concentración de las partículas. Un período (72) de tiempo de iluminación en el que la partícula está siendo iluminada puede ser determinado por la velocidad de flujo y el tamaño de la partícula en la dirección del flujo. Cuando la partícula puede ser iluminada por un láser pulsado que genera pulsos (73) de emisión individuales que pueden ocurrir en períodos entre pulsos mucho menores que el período (72) de iluminación de la partícula, entonces pueden derivarse un gran número de pulsos de emisión individuales de la partícula (74). Por el contrario, cuando una partícula puede ser iluminada durante el mismo período por un láser de onda continua (OC), puede haber una emisión larga durante el período (75), que comúnmente se puede detectar como un perfil de picos de corriente durante el período. Una medición de la emisión de partículas iluminadas por láseres de OC son eventos analógicos largos únicos sin puntos de corte internos naturales y entonces o bien se puede integrar todo el valor, o se puede muestrear el evento en una multitud de tiempos discretos, o se integran segmentos del evento.

En otras realizaciones, los láseres se pueden usar donde la duración del pulso de iluminación puede ser mucho más pequeño que un período entre pulsos que en sí mismo puede ser mucho más corto que el período (72) de iluminación de la partícula. Por ejemplo, cuando se usa el láser Vanguard para la clasificación de esperma aproximadamente a razón de 25.000 eventos por segundo, el láser que tiene 80.000.000 de pulsos de iluminación por segundo suministrará aproximadamente 3.000 pulsos por evento, y se producirán alrededor de 5-10% o 150-300 pulsos en el período (72) de iluminación de la partícula. Además, la duración del pulso es de aproximadamente 10 picosegundos (10-11 segundos), el período entre pulsos es de aproximadamente 10 nanosegundos (10-8 segundos), y el período de emisión del pulsos es de menos de 1 nanosegundo.

Como puede entenderse a partir de la figura 12, un pulso de iluminación puede iniciar una rutina de detección. La presente invención puede utilizar pulsos de láser como un reloj interno para todo el sistema de análisis. Las ventajas son que cada pulso de iluminación, que es muy breve y muy fuerte, puede ser usado para iniciar cada ciclo de reloj. Dentro de un único ciclo de reloj, se puede ejecutar una subrutina de cálculo que utiliza el período de pausa para calcular los valores específicos para cada evento de iluminación/emisión, y almacenar en caché el resultado antes del inicio del siguiente ciclo de reloj. Un análisis de las partículas individuales podría manifestarse sobre un múltiplo de los ciclos de reloj (por ejemplo 150-300), de tal manera que puede ocurrir un análisis estadístico de todos los eventos de emisión de asignación en una sola partícula, y los valores promediados relacionados con la medición de la cantidad de partículas y la posición de la partícula se pueden almacenar en caché. El período entre un múltiplo de eventos, que pueden ser dominados por períodos sin emisiones, se puede utilizar para mapear la identidad y las distancias y el uso de los criterios de compuerta momentáneos para efectuar la clasificación. Los valores de los parámetros de operación y los resultados dentro de cada clasificación se pueden almacenar en caché para su consulta al nivel de 1 minuto, posiblemente el estado del operador y se pueden generar gráficos o sumatorias para ejecutar clasificaciones completas. En la figura 17, utilizando el ejemplo del esperma que es clasificado usando un láser Vanguard, el ciclo de reloj puede ser de aproximadamente 10^{-8} segundos. Cada ciclo de reloj abarca tres períodos. El pulso de iluminación de 10^{-11} segundos, el período de emisión de 10^{-9} segundos, y el período de reposo de 9×10^{-9} segundos. Cada ciclo (77) de reloj se produce aproximadamente 300 veces en cada evento de análisis de 3×10^{-6} segundos. El tiempo entre eventos de análisis promedia 2×10^{-5} segundos. El tiempo entre cada análisis y la clasificación (79) es de aproximadamente 5×10^{-2} segundos. Los operadores por lo general quieren observar los datos históricos netos durante el minuto (80) más reciente y ser capaces de ver el progreso/historia de los datos sobre toda la muestra desde el inicio de una clasificación (81).

Puede haber muchas capas jerárquicas de datos que se producen de forma dinámica. Al mismo tiempo, con una cantidad de boquillas, todas clasificando la misma muestra al mismo tiempo, hay eventos simultáneos que se

- 5 producen en cada boquilla en cada capa jerárquica. Como sería un trabajo duro y poco eficiente para el operador controlar cada boquilla, el análisis estadístico y el mapeo algorítmico deben permitirle al operador ver el estado, la historia y los promedios de todas las boquillas en su conjunto y tener en cuenta sólo boquillas que no están funcionando cerca de la media del grupo. El operador también necesita usar comandos para cambiar la clasificación, que debe efectuar todas las boquillas a la vez.
- 10 Los datos también pueden ser compartidos entre las funciones de control a través de múltiples boquillas y con el tiempo para permitir que el sistema realice ajustes automáticos tales como: ajuste de las posiciones de los espejos ópticos para asegurar la misma luz láser en cada haz; el seguimiento del desempeño de cada boquilla para hacer la identificación temprana de eventos de oclusión de las boquillas; seguimiento del desempeño de cada boquilla para identificar las velocidades de flujo diferenciales e incluso comparar una o más muestras de semen mediante comparaciones directas.
- 15 Todos estos diversos cálculos, en tiempo real, pueden calibrarse de manera muy precisa en el tiempo, ya que todos pueden utilizar el reloj láser de muy alta frecuencia. Por lo tanto, en el citómetro de flujo en paralelo, un láser pulsado puede servir como un componente de integración importante para todos los datos que se generan en una multiplicidad de boquillas.
- 20 Haciendo referencia principalmente a la figura 13, ya que puede ser deseable teñir las muestras justo antes de la clasificación, la clasificación de una muestra durante un período de tiempo antes de la tinción de una segunda muestra que puede haber sido clasificada y repetir este proceso varias veces pueden crear muestras que han sido teñidas y clasificadas en diferentes momentos, pero pueden ser agrupadas como un solo lote. Los datos (82) agregados para cada muestra pueden ser comparados a través de una multiplicidad de boquillas y múltiples clasificaciones (83), por ejemplo, del mismo eyaculado de un cierto toro. Las comparaciones del mismo toro durante varios días (84) y las comparaciones entre diferentes toros (85) pueden producir una historia. Los datos de esta historia pueden residir dentro del sistema operativo y pueden ser utilizados para ayudar a los operadores en la elección de las concentraciones de colorante o las veces, o para ayudar a identificar eyaculados que se clasifican peor que su clasificación normal. Además, si está disponible el análisis complejo de alto rendimiento, se pueden determinar las relaciones de sexo predichas con respecto a las relaciones de sexo reales, y las relaciones de sexo agregadas se pueden comparar para identificar los ajustes y métodos que los distintos operadores puedan estar usando, o para identificar a los operadores que están recibiendo constantemente resultados más bajos. Además, las tendencias en el desempeño de clasificación pueden hacer visibles que disponen un mantenimiento especial tal como la limpieza de la óptica, el reemplazo de una boquilla, montajes de espejos.
- 30 Con referencia ahora principalmente a las figuras 14 a 18, se muestran las realizaciones de la invención y las realizaciones comparativas usando un láser pulsado en el contexto de la clasificación del flujo de células espermáticas. Se muestran varios resultados de experimentos llevados a cabo con diferentes potencias de haces de radiación. Los diferentes experimentos incluyeron 20 mW (no de acuerdo con la invención), 60 mW (no de acuerdo con la invención), 90 mW (no de acuerdo con la invención), 130 mW y 160 mW de potencia y cada potencia fue creada usando filtros de densidad neutra. Estas realizaciones pueden proporcionar una clasificación del esperma de alta pureza para el enriquecimiento de células espermáticas que contienen al cromosoma X o Y que puede incluso ser de hasta 98% en pureza.
- 35 En aún otras realizaciones, la presente invención puede proporcionar la recolección de al menos dos poblaciones de partículas de la muestra, más específicamente, la recolección de una población clasificada de esperma que contiene al cromosoma X y la recolección de una población clasificada de esperma que contiene al cromosoma Y. Se puede proveer un recolector par a recolectar cada población clasificada. Por consiguiente, la presente invención puede incluir un recolector de esperma que contiene al cromosoma X y un recolector de esperma que contiene al cromosoma Y. Puede ser importante clasificar y recolectar cada población con una alta pureza. Una población clasificada de alta pureza de esperma que contiene al cromosoma X y dicho esperma que contiene al cromosoma Y pueden incluir un porcentaje de pureza. Por supuesto, puede existir cualquier porcentaje de pureza y algunos ejemplos pueden incluir:
- 40
- 45
- 50
- 55 - superior al 85% de pureza;
 - superior al 90% de pureza;
 - superior al 95% de pureza;
 - superior al 96% de pureza; y
 - superior al 98% de pureza.
- 60 Otros porcentajes de pureza son ciertamente posibles y todos deben entenderse como representados dentro del alcance de esta invención.
- 65 Los láseres pulsados típicos que tienen características similares a las que figuran en la Tabla 1 o la Tabla 2 se pueden usar con la invención.

Tabla 1.

Vanguard de 150mW de potencia de salida
Potencia de salida promedio [W]
0,15
Tamaño del haz UV [mm]
1
Energía por pulso [J]
1.875E-09
Potencia de pico [W]
234.375
Potencia por cm ² [W/cm ²]
2.98E+04

Tabla 2.

Vanguard de 350mW de potencia de salida
Potencia de salida promedio [W]
0,35
Tamaño del haz UV [mm]
1
Energía por pulso [J]
4.375E-09
Pico por pulso [W]
546.875
Potencia por cm ² [W/cm ²]
6.96E+04

5 Las Figuras 14 a 18 muestran histogramas de una sola variable y gráficos de puntos de dos variables de la clasificación de células espermáticas de bovino teñidas con Hoechst 33342. Las células espermáticas clasificadas se obtuvieron del mismo esperma de toro recién eyaculado diluido hasta 200×10^6 células espermáticas por mL y se incubaron en Hoechst 33342 a 34°C durante 45 min.

10 Con respecto a los histogramas particulares y a los gráficos de dos variables mostrados por las Figuras 14 a 19, la velocidad de eventos (iluminación de las células espermáticas a medida que pasan a través del haz láser pulsado) se estableció en 20.000 eventos por segundo. La velocidad de clasificación (separación de las células espermáticas diferenciadas por análisis) en subpoblaciones varió desde 850 hasta 3500 dependiendo de la potencia utilizada. Los resultados también se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3.

Ajuste de la potencia del láser de pulsos	Pureza de X en %	Pureza de Y en %
Pulsado a 20 mW (no de acuerdo con la invención)	96,5	91,0
Ajuste de la potencia del láser de pulsos	Pureza de X en %	Pureza de Y en %
Pulsado a 60 mW (no de acuerdo con la invención)	93,5	85,5
Pulsado a 90 mW (no de acuerdo con la invención)	96,0	89,5
Pulsado a 130 mW	96,0	91,0
Pulsado a 160 mW	97,0	93,0

20 Como se puede entender a partir de la Tabla 3, utilizando un láser pulsado se pueden clasificar células espermáticas en subpoblaciones de alta pureza que contienen al cromosoma X y al cromosoma Y. Para cada ajuste de la potencia del láser entre 20 mW y 160 mW, las subpoblaciones clasificadas tenían una pureza de hasta 97,0% del tipo de sexo correcto.

25 Con referencia ahora principalmente a la Figura 19, los histogramas comparan la resolución de la misma muestra de células espermáticas utilizando tecnología de clasificación de flujo de OC y con una forma de realización de la invención de clasificación de flujo utilizando un haz láser pulsado. Es importante destacar que la iluminación con láser pulsado de células espermáticas teñidas ofrece una resolución superior de las células espermáticas que contienen al cromosoma X y de las células espermáticas que contienen al cromosoma Y. Esto es cierto incluso cuando el haz láser pulsado tiene una potencia significativamente más baja que la comparada con la tecnología convencional de clasificador de flujo de OC. Incluso cuando la potencia pulsada es de 130 mW, 70 mW o incluso 20/150 de la potencia utilizada en la comparada con la tecnología del clasificador de flujo de OC. Los histogramas de los experimentos de láser pulsado muestran una separación más limpia de los dos picos en comparación con los experimentos de onda continua.

35 En formas de realización, la presente invención puede incluir proporcionar una alta resolución de una población clasificada de células espermáticas. Una resolución más alta puede ser indicativa de la pureza de una población clasificada. Si bien pueden existir muchos valores de resolución diferentes, algunos ejemplos de altas resoluciones

pueden incluir:

- 5
- superior a 7,0;
 - superior a 7,5;
 - superior a 8,0;
 - superior a 8,5;
 - superior a 9,0; y
 - superior a 9,2.

10 Por supuesto, pueden existir otros valores de resolución y se entiende que todos están representados dentro del alcance de la invención.

15 Como se discutió anteriormente, los análisis de partículas con una potencia láser menor, y en esta forma de realización particular de las células espermáticas de la invención, resuelve el problema de larga data de tener que disponer de una fuente de láser dedicada para cada clasificador de flujo. Al reducir la potencia requerida del láser, incluso sin el logro de ningún otro beneficio, se pueden operar múltiples citómetros de flujo, clasificadores de flujo, o clasificadores de células utilizando una sola fuente de láser. Por ejemplo, cuando la clasificación se logra aproximadamente a 20 mW, se puede usar un solo láser pulsado de 350 mW para proporcionar luz de iluminación para tantos como 18 citómetros de flujo que funcionan por separado o clasificadores de flujo utilizados para separar las células espermáticas con base en que porta un cromosoma X o Y.

20 Con referencia de nuevo a la Figura 19, otro beneficio importante proporcionada por un láser pulsado, se puede incrementar la resolución de la invención en el contexto de la clasificación de células espermáticas de las subpoblaciones que contienen al cromosoma X las que contienen al cromosoma Y incluso cuando las muestras de células espermáticas, tales como aquellas utilizadas en este ejemplo específico, se almacenan durante largos períodos de tiempo aproximadamente a 5°C, tal como 18 horas o más largos, o congelado y descongelado antes de la tinción y el análisis, se puede mejorar la resolución de las células espermáticas clasificadas con la invención de láser pulsado comparado con la tecnología convencional de láser de OC.

25 En formas de realización, la presente invención puede incluir la clasificación células espermáticas con una tasa de coincidencia baja. Algunos ejemplos de las bajas tasas de coincidencia pueden incluir:

- 35
- menos de 4.400;
 - menos de 4.000;
 - menos de 3.700; y
 - menos de 3.600.

Nuevamente, otras tasas de coincidencia baja son ciertamente posibles y se debe entender que todas están representadas dentro del alcance de esta invención.

40 La presente invención puede incluir, en formas de realización, la recolección de poblaciones clasificadas de células espermáticas con una alta tasa de recolección. Una alta recolección puede aumentar la productividad e incluso la eficiencia. Algunos ejemplos de los altos niveles de recolección pueden incluir:

- 45
- superior a 2.400 células espermáticas por segundo;
 - superior a 2.600 células espermáticas por segundo;
 - superior a 2.900 células espermáticas por segundo;
 - superior a 3.000 células espermáticas por segundo; y
 - superior a 3.100 células espermáticas por segundo.

50 Otras tasas de recolección son posibles y se pretende que todas estén incluidas dentro del alcance de esta invención.

55 En aún otras realizaciones, la presente invención puede incluir la detección de células espermáticas a una tasa de eventos de entre aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 60.000 células espermáticas por segundo. Por supuesto, una tasa de eventos puede ser superior a 10.000 o incluso inferior a 60.000 células por segundo.

60 Una de las ventajas con respecto a la clasificación de las células espermáticas utilizando la invención del láser pulsado puede ser mayores velocidades de clasificación. Cuando se aumenta la resolución de una muestra particular, se puede aumentar la tasa de clasificación de subpoblaciones de células espermáticas hasta una pureza dada.

Otro de los beneficios con respecto a la clasificación de las células espermáticas utilizando la invención del láser pulsado puede ser una clasificación de mayor pureza. Cuando se aumenta la resolución de una muestra particular, se puede aumentar la pureza de las subpoblaciones de células espermáticas.

65 Se puede entender que una invención de láser pulsado tiene aplicación con respecto a cualquier característica

particular de las partículas que puede diferenciarse mediante el cambio de la intensidad de la iluminación o por la emisión detectable de luz tras la iluminación con un rayo de luz pulsada. Aunque el solicitante ha proporcionado ejemplos específicos de la diferenciación de la cantidad de ADN dentro de una célula utilizando la invención, debe entenderse que estos ejemplos son ilustrativos de cómo elaborar y utilizar la invención con respecto a la amplia variedad de células espermáticas obtenidas a partir de cualquier especie de mamífero tal como cualquier tipo o clase de células espermáticas de bovino, ovino, porcino o equino; o células espermáticas obtenidas de cualquier tipo o especie de alce, ciervo, buey, búfalo, cabras, camellos, conejos, o lama; o células espermáticas obtenidas de cualquier mamífero marino tal como ballenas o delfines; o células espermáticas obtenidas a partir de cualquier especie rara de mamífero o en peligro; o células espermáticas obtenidas de una especie zoológica de mamífero; o células espermáticas obtenidas de un individuo raro o premiado de una especie de mamífero; o células espermáticas obtenidas de un individuo de una especie de mamífero que utiliza para producir lácteos o productos cárnicos. En formas de realización, las células espermáticas pueden incluir cualquier tipo de células espermáticas, tales como, pero no limitado a, células espermáticas de mamíferos como bovinos, células espermáticas de equinos, células espermáticas de porcinos, células espermáticas de ovinos, células espermáticas de camélidos, células espermáticas de rumiantes, células espermáticas de caninos.

Se entiende que la presente invención puede existir en ventajas únicas cuando se combina con otros aspectos de las diversas referencias incorporadas.

Debe entenderse también que estos ejemplos específicos proporcionados pretenden ser ilustrativos de cómo elaborar y utilizar las numerosas formas de realización de la invención para la aplicación con dispositivos analíticos tales como citómetros de flujo, clasificadores de células, analizadores de microarreglos, microscopios de formación imágenes, o equipos de formación de imágenes micro, que pueden ser fácilmente contruidos para contener dos o más, y quizás miles o incluso millones de canales paralelos para el análisis y, en tal forma que cada uno de estos canales separados es capaz de realizar una función idéntica o muy similar a una única boquilla para clasificación de citometría de flujo, que se pueden considerar "máquinas", y se entiende que incluso un dispositivo muy pequeño que podría ser sostenido en la mano de una persona, puede contener muchos cientos o muchos miles de tales "máquinas".

Ejemplo 1.

Se utilizan cabezas de esperma de toro fijas y purificadas (también descritas como núcleos de esperma de toro), teñidas en condiciones estándar con colorante Hoechst 33342 que se une al ADN, como estándar de desempeño para calibrar un citómetro de flujo para clasificación de esperma antes de la clasificación de esperma vivo. Un láser pulsado (Spectrophysics VNGD350-HMD355) que suministra 300 mW de energía a 355 nm y 80 MHz ilumina la corriente de análisis de las muestras en un citómetro de flujo que opera en configuraciones estándar y proporciona el gráfico del histograma mostrado en la Fig. del Ej. 1. Esto demuestra que un citómetro de flujo estándar para clasificación de esperma equipado con el láser pulsado es capaz de resolver núcleos de esperma de toro en poblaciones que contienen al cromosoma X y que contienen al cromosoma Y utilizando condiciones estándar.

Ejemplo 2.

Una muestra de esperma vivo de toro se tiñe en condiciones estándar con colorante Hoechst 33342 que se enlaza al ADN. Un láser pulsado (Spectrophysics VNGD350-HMD355) que suministra 300 mW de energía a 355 nm y 80 MHz ilumina la corriente para análisis de la muestra en un citómetro de flujo que opera con ajustes estándar que clasifica dicho esperma y proporciona el gráfico del histograma que se muestra en la figura del Ejemplo 2. Esto demuestra que un citómetro de flujo estándar para clasificación del esperma equipado con el láser pulsado es capaz de resolver el esperma vivo en poblaciones que contienen al cromosoma X y al cromosoma Y bajo condiciones estándar.

La muestra anterior se clasifica mediante la recolección del esperma que contiene al cromosoma X, y la tasa de recolección para clasificación es de 3800 de esperma vivo que contiene al cromosoma X por segundo. Un análisis complejo de la muestra preparada en dicha forma midió que la pureza de dicha muestra clasificada era del 95%. Esto demuestra que un citómetro de flujo estándar para clasificación de esperma equipado con el láser pulsado es capaz de enriquecer el contenido de una población de esperma desde uno en el cual aproximadamente el 50% del esperma es esperma que contiene al cromosoma X, hasta uno en el que 95% del esperma es esperma que contiene al cromosoma X.

Dicho esperma clasificado anteriormente es procesado posteriormente por métodos estándar para envasarlo en pajuelas de inseminación artificial, se criopreserva por el método estándar de congelación, y se descongela para el análisis de motilidad de los espermatozoides. El porcentaje de motilidad en varios puntos en el procedimiento se determina que es: Después de coloración del 80%, después de la clasificación del 70%, después de enfriamiento del 65%, después de la congelación y descongelación a los 0 minutos del 45%, 30 minutos después de la descongelación del 45%, 120 minutos después de la descongelación del 35 %. Esto demuestra que un citómetro de flujo estándar para clasificación de esperma equipado con el láser pulsado es capaz de enriquecer las muestras de esperma vivo teñido que parece normal con respecto a la movilidad de los espermatozoides.

Ejemplo 3

5 Una muestra de esperma vivo de toro se tiñe en condiciones estándar con colorante Hoechst 33342 que se enlaza al ADN. Un láser pulsado (Spectrophysics VNGD350-HMD355) que suministra 300 mW de energía a 355 nm y 80 MHz está equipado con divisores de haz y filtros de densidad neutros, en cinco condiciones separadas, para proporcionar niveles de energía del haz de iluminación de 160 mW (53% de la potencia del haz), 130 mW (43% de la potencia del haz), 90 mW (30% de la potencia del haz), 60 mW (20% de la potencia del haz), y 20 mW (6,6% de la potencia del haz), respectivamente, para iluminar la corriente de análisis de la muestra de un citómetro de flujo de clasificación para clasificación del esperma que opera con una configuración estándar para clasificación de dicho esperma teñido y proporcionar los 5 gráficos de histograma que se muestran en el Ejemplo 3 de la Figura 3. Esto demuestra que un citómetro de flujo estándar para clasificación del esperma equipado con el láser pulsado es capaz de resolver claramente espermatozoides vivos con energías tan bajas como 60 mW (20% del haz).

15 Las muestras anteriores se clasifican en cada una de las 5 configuraciones de energía del haz para recolección del esperma que contiene al cromosoma X y del esperma que contiene al cromosoma Y en fracciones separadas, y la tasa de recolección para clasificación es de 850-3500 de esperma vivo que contiene al cromosoma X o que contiene al cromosoma Y por segundo, dependiendo de la potencia utilizada, con potencias inferiores asociadas con tasas de recolección inferiores. Un análisis complejo de las muestras preparadas en dicha forma mide la pureza de dichas muestras clasificadas como se muestra en la Tabla del Ejemplo 3. Esto demuestra que un citómetro de flujo estándar para clasificación del esperma equipado con el láser pulsado que suministra energías de haz en el rango de 20 mW a 160 mW es consistentemente capaz de enriquecer el contenido de una población de esperma desde uno en el cual aproximadamente el 50% del esperma es esperma que contiene al cromosoma X, hasta uno en el que 95% o más del esperma es esperma que contiene al cromosoma X, y al mismo tiempo hasta uno en el que el 90% o más del esperma es esperma que contiene al cromosoma Y.

Tabla 4

Energía del haz (Pulsada)	% de Pureza - X	% de Pureza - Y
20 mW	96,5	91,0
60 mW	93,5	85,5
90 mW	96,0	89,5
130 mW	96,0	91,0
160 mW	97,0	93,0

Ejemplo 4

30 Una muestra de esperma vivo de toro se tiñe en condiciones estándar con colorante Hoechst 33342 que se enlaza al ADN. Un láser pulsado (Spectrophysics VNGD350-HMD355) que suministra 300 mW de energía a 355 nm y 80 MHz está equipado con divisores de haz y filtros de densidad neutros, en dos condiciones separadas, para proporcionar niveles del haz de energía de iluminación de 130 mW (43% de la potencia del haz) y 70 mW (23% de la potencia del haz), respectivamente, a la corriente de análisis de la muestra de un citómetro de flujo que opera en las configuraciones estándar de clasificación de dicho esperma teñido. Como comparación, la misma muestra se analiza en dos citómetros de flujo idénticos pero diferentes que operan en configuraciones estándar y equipados con láseres de OC (onda continua) que suministran 150 mW en ambos casos. Esto demuestra que incluso con energías de haz inferiores, un citómetro de flujo estándar para clasificación de esperma equipado con el láser pulsado proporciona una capacidad de resolución superior en comparación con un mismo citómetro de flujo estándar para clasificación de esperma o equipado con un láser estándar de OC.

Ejemplo 5

45 Una muestra de esperma vivo de toro se tiñe en condiciones estándar con colorante Hoechst 33342 que se enlaza al ADN con la concentración estándar de Hoechst 33342 que se define como el nivel de 100% del colorante (control). Se preparan dos muestras adicionales que son idénticas excepto que se tiñen con 80% o 60% de la cantidad de colorante Hoechst 33342, respectivamente. Un láser pulsado (Spectrophysics VNGD350-HMD355) que suministra 300 mW de energía a 355 nm y 80 MHz está equipado con divisores de haz y filtros de densidad neutros, en dos condiciones separadas, para proporcionar niveles de haz de energía de iluminación de 150 mW (50% de la potencia del haz) y 90 mW (30% de la potencia del haz), respectivamente, a la corriente de análisis de la muestra de un citómetro de flujo que opera en las configuraciones estándar de clasificación de dicho esperma teñido con 3 concentraciones diferentes de colorante utilizados. La resolución entre el esperma que contiene al cromosoma X y el que contiene al cromosoma Y para estas 6 condiciones está en los 6 gráficos de histograma mostrados en la figura del Ej. 5. Esto demuestra que cantidades menores del colorante Hoechst 33342 se pueden usar para preparar muestras de esperma para clasificación en un citómetro de flujo estándar para clasificación de esperma, si se utilizan también mayores energías del haz pulsado.

Ejemplo 6

Se utilizan cabezas de esperma de toro fijas y purificadas (también descritas como núcleos de esperma de toro), teñidas en condiciones estándar con colorante Hoechst 33342 que se une al ADN, como estándar de desempeño para calibrar un citómetro de flujo para clasificación de esperma antes de la clasificación de esperma vivo. Un láser pulsado (Spectrophysics VNGD350-HMD355) que suministra 300 mW de energía a 355 nm y 80 MHz y equipado con un divisor de haz para proporcionar un nivel del haz de energía de iluminación de 150 mW (50% de la potencia del haz) ilumina la corriente de análisis de la muestra de un citómetro de flujo que opera en las configuraciones estándar. Dichos núcleos teñidos se analizan a razón de 20.000 eventos/segundo (una tasa comparable a la tasa utilizada en el análisis de esperma vivo de toro), así como a razón de 59.000 eventos/segundo. La resolución entre los núcleos del esperma de toro que contiene al cromosoma X y al cromosoma Y para estas 2 condiciones de velocidad del evento se presenta en los dos gráficos de histograma que se muestran en la figura del Ej. 6. Esto demuestra, que para partículas ideales tales como los estándares de los núcleos, las velocidades del evento de análisis pueden incrementarse tanto como 3 veces con solo una pequeña pérdida en la resolución entre los núcleos de esperma de toro que contienen al cromosoma X y al cromosoma Y.

Ejemplo 7

Se tiñeron las muestras de esperma vivo de toro de 4 toros diferentes en condiciones estándar con colorante Hoechst 33342 que se enlaza al ADN. Un láser pulsado (Spectrophysics VNGD350-HMD355) que suministra 300 mW de energía a 355 nm y 80 MHz está equipado con divisores del haz y filtros de densidad neutros, en dos condiciones separadas, para proporcionar niveles del haz de energía de iluminación de 300 mW (100% de la potencia del haz) y 150 mW (50% > de la potencia del haz), respectivamente, a las corrientes de análisis de la muestra de un citómetro de flujo que opera en las configuraciones estándar para clasificación de dichas muestras de esperma teñidas. Como comparación, las mismas muestras se clasifican en un citómetro de flujo idéntico pero diferente que opera en configuraciones estándar y está equipado con un láser de OC (onda continua) que suministra 150 mW de energía en el haz de iluminación. Las muestras se clasifican a granel, lo que significa que se combinan tanto fracciones de esperma que contienen al cromosoma X como las que contienen al cromosoma Y. Las muestras de esperma clasificadas se criopreservan utilizando procedimientos estándar y se obtiene el puntaje del porcentaje de motilidades del esperma luego de descongelación, así como el porcentaje de vivos y muertos utilizando coloración con PI con el análisis de citometría de flujo. Los promedios para los 4 toros con las 3 condiciones de iluminación diferentes se muestran en la Tabla 5. Esto demuestra, sin significancia estadística, que las tres condiciones de iluminación produjeron números similares de esperma viable intacto después de la clasificación.

Tabla 5

Láser (mW)	% de Motilidad 0 min después de la descongelación	% de Motilidad 90 min después de la descongelación	% de Vivos 0 min después de la descongelación	% de Vivos 0 min después de la descongelación
OC (150 mW)	50,0	42,5	43,5	40,6
Pulsado (150 mW)	46,3	42,5	40,0	37,9
Pulsado (300 mW)	48,1	36,3	40,3	37,2

Ejemplo 8

Las muestras de esperma vivo de toro de 5 toros diferentes se tiñen en condiciones estándar con el colorante Hoechst 33342 que se enlaza al ADN, estando la concentración estándar de Hoechst 33342 definida como el nivel del 100% del colorante (control). Se preparan dos muestras adicionales de los mismos 5 toros que son idénticas excepto que se tiñen con 80% o 60% > de la cantidad del colorante Hoechst 33342, respectivamente.

Un láser pulsado (Spectrophysics VNGD350-HMD355) que suministra 300 mW de energía a 355 nm y 80 MHz está equipado con divisores de haz y filtros de densidad neutros, en dos condiciones separadas, para proporcionar niveles de haz de energía de iluminación de 150 mW (50% de la potencia del haz) y 90 mW (30% de la potencia del haz), respectivamente, a la corriente de análisis de la muestra de un citómetro de flujo que opera en configuraciones estándar para clasificación de dichas muestras de esperma teñidas. Como comparación, las mismas muestras se clasifican en un citómetro de flujo idéntico pero diferente que opera en configuraciones estándar y equipado con un láser de OC (onda continua) que suministra 150 mW de energía en el haz de iluminación.

Para los procedimientos de clasificación de todas estas muestras, se comparan los valores medios para la resolución (los valores más altos son mejores), las tasas de coincidencia (los valores más bajos son mejores), las velocidades de recolección para clasificación (valores más altos son mejores) y se muestran en la Tabla 6. Esto demuestra que las eficiencias de clasificación en todas las condiciones ensayadas con el láser pulsado eran iguales o mejores que las eficiencias de clasificación logradas utilizando el láser estándar de OC.

Tabla 6

Colorante (%) / Láser (mW)	Resolución	Tasa de coincidencia	Velocidad de clasificación
100 / 150 pulsado	8,0	3570	3160
100 / 90 pulsado	9,3	3560	2610
80 / 150 pulsado	8,2	3600	3160
80 / 90 pulsado	9,6	3500	2480
60 / 150 pulsado	8,6	3600	2940
60 / 90 pulsado	9,8	3520	2450
100 / 150 de OC	7,6	4380	2720

5 Las mismas muestras se clasifican a granel, lo que significa que se combinan tanto las fracciones de esperma que contienen al cromosoma X como al cromosoma Y. Las muestras de esperma clasificadas se criopreservan utilizando procedimientos estándar y se registra el porcentaje de motilidades posteriores a la descongelación, así como el porcentaje de vivos / muertos usando coloración con PI con análisis por citometría de flujo. Los promedios de los 5 toros con las 7 condiciones diferentes de coloración y de iluminación se muestran en la Tabla 7. Esto demuestra que la viabilidad del esperma y los recuentos vivos en todas las condiciones ensayadas con el láser pulsado eran iguales o mejor que la viabilidad del esperma y los recuentos vivos logrados usando el láser estándar de OC y colorante estándar.

Tabla 7

Colorante (%) / Láser (mW)	% de Motilidad 0 min después de la descongelación	% de Motilidad 120 min después de la descongelación	% de Vivos 30 min después de la descongelación	% de Vivos 120 min después de la descongelación
100 / 150 pulsado	43,3	34,0	36,8	32,4
100 / 90 pulsado	42,8	33,5	35,3	33,2
80 / 150 pulsado	42,8	33,8	35,1	35,1
80 / 90 pulsado	42,0	35,3	35,2	29,7
60 / 150 pulsado	40,8	31,0	35,8	35,1
60 / 90 pulsado	41,0	32,8	34,4	33,7
100 / 150 de OC	39,8	33,3	33,4	28,6

15 Ejemplo 9

20 Las muestras de esperma vivo de toro de 5 toros diferentes y 2-6 repeticiones se tiñeron en condiciones estándar con colorante Hoechst 33342 que se enlaza al ADN (80%) y se clasifican a granel bajo condiciones estándar en un citómetro de flujo para clasificación del esperma a velocidades por evento de 23.000 espermatozoides/segundo. Un láser pulsado (Spectrophysics VNGD350-HMD355) que suministra 300 mW de energía a 355 nm y 80 MHz está equipado con divisor de haz para proporcionar un nivel de haz de energía de iluminación de 150 mW (50% de la potencia del haz) a la corriente de análisis de muestras de un citómetro de flujo que opera con configuraciones estándar para la clasificación de dichas muestras de esperma teñidas.

25 Como comparación de control, las mismas muestras de esperma vivo de toro de 5 toros diferentes y 2-6 repeticiones se tiñeron en condiciones estándar con colorante Hoechst 33342 que se enlaza al ADN (100%) y estas muestras se clasificaron en un citómetro de flujo idéntico pero diferente que opera en configuraciones estándar y equipado con un láser de OC (onda continua) que suministra 150 mW de energía en el haz de iluminación.

30 Dichas diversas muestras de esperma se utilizaron en concentraciones de 200.000 espermatozoides/ml o 1 millón de espermatozoides/ml para inseminar ovocitos bovinos madurados en procedimientos estándar de fertilización in vitro (FIV). Se midieron la división y aparición de 2 células a los 2,75 días después de la inseminación, la velocidad de desarrollo de blastocistos a los 7,75 días después de la inseminación, el número total de células en blastocisto y la calidad del blastocisto a los 7,75 días. Los resultados promedio para 587 ovocitos inseminados con esperma clasificado preparado a partir del sistema equipado con el láser pulsado, y para 558 ovocitos inseminados con esperma clasificado preparado a partir del sistema equipado con el láser de OC se muestran en la Tabla 8. Nota: Números más bajos para la calidad del blastocisto son mejores. Esto demuestra que el esperma preparado por un citómetro de flujo estándar para clasificación del esperma equipado con el láser pulsado es capaz de fecundar los ovocitos en los procedimientos estándar de FIV y presenta tasas similares de división y blastocisto, siendo la calidad media de los blastocistos ligeramente mejor cuando se inseminan con esperma clasificado utilizando el citómetro de flujo estándar equipado con el láser pulsado.

Tabla 8

Láser (mW)	% de División	% de 2 Células	% de blastocisto	Calidad del blastocisto	Recuento de células en blastocisto
OC (150 mW)	50,7	27,3	6,7	2,7	131,8
Pulsado (150 mW)	49,7	29,5	5,2	2,1	136,2

Ejemplo 10

Las muestras de esperma vivo de toro de 3 toros diferentes, en diferentes días, se tiñeron en condiciones estándar con colorante Hoechst 33342 que se enlaza al ADN (100% >) y se clasificaron a granel bajo condiciones estándar en un citómetro de flujo para clasificación del esperma a velocidades de evento de 20-23.000 espermatozoides/segundo. Un láser pulsado (Spectrophysics VNGD350-HMD355) que suministra 300 mW de energía a 355 nm y 80 MHz está equipado con un divisor de haz para proporcionar un nivel de haz de energía de iluminación de 150 mW (50% de la potencia del haz) a la corriente para análisis de muestras de un citómetro de flujo que opera con configuraciones estándar para clasificación de dichas muestras espermáticas teñidas.

Como comparación de control, se tiñeron las mismas muestras de esperma vivo de toro de los mismos 3 toros diferentes en el mismo día en condiciones estándar con colorante Hoechst 33342 que se enlaza al ADN (100%) y se clasificaron estas muestras en un citómetro de flujo idéntico pero diferente que opera con configuraciones estándar y equipado con un láser de OC (onda continua) que suministra 150 mW de energía en el haz de iluminación.

Dichas diversas muestras de esperma se utilizaron en cantidades de 2 millones de espermatozoides por pajilla de inseminación artificial criopreservada que contenía 0,25 ml de fluido.

Se utilizaron pajillas de control que contenían 10 millones de espermatozoides sin clasificar, y pajillas de control que contenían 2.000.000 X esperma enriquecido clasificado utilizando un citómetro de flujo para clasificación del esperma equipado con un láser estándar de OC.

En un análisis heteroespermático, se mezclaron X fracciones de clases de láser de OC en cantidades iguales de esperma con fracciones Y de las clasificaciones con láser pulsado para crear la comparación # 1. Se mezclaron las fracciones de Y de las clasificaciones con láser de OC en cantidades iguales de esperma con fracciones de X de clasificaciones con láser pulsado para crear la comparación # 2. La identificación del sexo en los fetos a los 60 días se utilizó como un marcador para asignar el resultado del sexo, y, en consecuencia, la condición probable (qué láser) se puede atribuir a una fertilización exitosa. El método heteroespermático es particularmente útil, ya que todos los demás factores diferentes al procedimiento de clasificación se controlan internamente en cada inseminación.

Novillas Holstein con un peso aproximadamente 750 libras fueron sincronizadas utilizando CIDR / Lutalasa. Después de eso fueron observadas (AM o PM) durante el período de calor y fueron inseminadas a las 12-24 horas después de la observación del calor. Usando 2 inseminadores, y un solo tratamiento de inseminación uterina profunda, con 5 grupos de prueba espaciados aproximadamente un mes, en una sola granja, se determinaron las tasas de preñez y el sexo del feto a los 60 días después de la inseminación utilizando ultrasonografía. Los resultados mostrados en la Tabla 9 demuestran que el esperma clasificado con un citómetro de flujo estándar para clasificación del esperma equipado con un láser pulsado produce tasas de preñez esencialmente idénticas que el esperma clasificado utilizando un citómetro de flujo estándar para clasificación del esperma equipado con el láser estándar de OC.

Tabla 9

Tipo de dosis de esperma	% de la tasa de concepción	Preñeces / Inseminaciones
Control sin características sexuales que contenía 10 millones de espermatozoides totales	62,5	55/88
Control con cromosoma X que contenía 2 millones de espermatozoides totales	56,4	101/179
Heteroespermático # 1 que contenía 2 millones de espermatozoides totales	50,0	45/90
Heteroespermático # 2 que contenía 2 millones de espermatozoides totales	58,4	52/89
Preñeces atribuidas al láser de OC	49,50%	48/97
Preñeces atribuidas al láser pulsado	50,50%	49/97

Ejemplo 11

Una muestra de esperma vivo de delfín se recogió junto a una piscina, se la envió por vía aérea, y se la tiñó con Hoechst 33342 aproximadamente 6 horas después de la recolección. Las eficiencias de clasificación para la única muestra teñida se analizaron luego en dos clasificadores idénticos de esperma Mo Flo SX, en un caso equipado con un láser pulsado (Spectrophysics VNGD350- HMD355) que suministra 300 mW de energía a 355 nm y 80 MHz equipado con un divisor de haz para proporcionar un nivel de haz de energía de iluminación de 150 mW (50% de la potencia del haz), y en el segundo caso con un láser Innova 90-6 (OC: onda continua) que suministra 150 mW de energía del haz. El eyaculado de delfín tiñó 3 veces, y en cada caso se clasificó durante aproximadamente 2 horas.

Usando el láser de OC, con velocidades de clasificación por eventos de 30.000/s, se observó una tasa promedio coincidencia de 6430/s, se recolectó el esperma que contenía al cromosoma X a una tasa promedio de 3450/s y se recolectó un total de 72 millones de espermatozoides en 7 horas para una recuperación promedio de 10,3 millones de espermatozoides por hora.

Usando el láser pulsado, con velocidades de clasificación por evento de 30.000/s, se observó una tasa promedio de coincidencia de 5400/s, se recolectó el esperma que contenía al cromosoma X a una tasa promedio de 3930/s y se recolectó un total de 79,5 millones de espermatozoides en 6,33 horas para una recuperación promedio de 12,6 millones de espermatozoides por hora.

5 El esperma recuperado de ambas muestras tiene purzas de X de > 95% y una motilidad después de la descongelación de > 50%.

10 Ejemplo 12

Una muestra de esperma vivo de canino se recogió de un perro común alojado en una perrera y se la tiñó aproximadamente 3 horas después con una cantidad no optimizada de Hoechst 33342. El esperma teñido se analizó mediante un clasificador de esperma estándar equipado con un láser pulsado (Spectrophysics VNGD350-HMD355) que suministra 300 mW de energía a 355 nm y 80 MHz equipado con un divisor de haz para proporcionar un nivel de haz de energía de iluminación de 150 mW (50% de potencia del haz). Aproximadamente el 43% de los espermatozoides se orientó correctamente. A partir del esperma canino teñido orientado correctamente, se recolectó aproximadamente el 32% como esperma que contenía al cromosoma X, y se recolectó aproximadamente el 36% como esperma que contenía al cromosoma Y. Una inspección visual a través de un microscopio mostró que un elevado número de esperma canino en ambas muestras era móvil.

20 Ejemplo 13

El láser estándar de OC utiliza un tubo catódico que requiere una entrada promedio de 12 KW de energía eléctrica, y un gran volumen de agua de refrigeración, o un enfriador con una carga de aproximadamente 15 KW. El láser pulsado (Spectrophysics VNGD350-HMD355 que suministra 300 MW de energía a 355 nm y 80 MHz) requiere aproximadamente 500 vatios (0,5 KW).

El láser estándar de OC también requiere el reemplazo del tubo catódico después de aproximadamente 5.000 horas de uso, con un coste de reemplazo de alrededor de \$ 12.000, mientras que se espera que el láser pulsado VNG tenga 30.000 y más horas de funcionamiento antes de la renovación del elemento de cabeza con costos similares.

Una operación comercial utilizando los citómetros de flujo de clasificación de esperma para clasificar esperma para la producción de pajillas de inseminación artificial, funcionando las 24 horas del día, durante todo el año, se puede esperar que opere los láseres durante 8.640 horas al año.

35 Las tarifas de los servicios públicos de agua y electricidad en Fort Collins suministradas para el año 2004 se utilizaron para calcular los gastos de funcionamiento del láser estándar de OC, en el primer caso refrigerado por agua de la red de servicios públicos y en el segundo caso se enfrió utilizando un enfriador eléctrico. El láser pulsado no requiere refrigeración. Los costes comparativos se muestran en la Tabla 10. Esto demuestra que el láser pulsado tiene beneficios significativos en la reducción de los costos de operación de un citómetro de flujo para clasificación del esperma.

Tabla 10

Componente del costo	Láser de OC con refrigeración con agua	Láser de OC con refrigeración mediante un refrigerador eléctrico	Láser pulsado
Tarifas eléctricas	\$ 4.389	\$ 9.828	\$ 183
Tarifas del agua	\$ 6.483	\$ 0	\$ 0
Tubo de láser o reconstruido	\$ 20.736	\$ 20.736	\$ 3.456
Total (1 año)	\$ 31.608	\$ 30.564	\$ 3.639

45

REIVINDICACIONES

1. Un método de procesamiento de muestras por citometría de flujo, que comprende las etapas de:
- 5 el establecimiento de al menos un fluido (3) envolvente;
- el flujo de dicho al menos un fluido envolvente en al menos dos boquillas (5);
- la inyección de al menos una muestra que puede ser irradiada en dicho al menos un fluido envolvente;
- la utilización de al menos un recurso compartido para procesar de dicha al menos una muestra que puede ser irradiada, en el que dicho al menos un recurso compartido incluye una fuente (12) de radiación;
- 10 sometimiento de dicha muestra que puede ser irradiada de dichas al menos dos boquillas a radiación a partir de dicha fuente (12) de radiación ;
- excitación de dicha muestra que puede ser irradiada de dichas al menos dos boquillas con dicha radiación a partir de dicha fuente (12) de radiación ;
- emisión de fluorescencia a partir de dicha muestra excitada;
- 15 detectar una cantidad de dicha fluorescencia emitida desde cada partícula en dicha muestra;
- evaluar dicha cantidad de fluorescencia emitida desde cada partícula en dicha muestra;
- seleccionar una condición eléctrica que se asocia con cada partícula de dicha muestra en dicho flujo de fluido envolvente;
- 20 cargar una corriente de dicha muestra que puede ser irradiada y fluido envolvente con base en las propiedades deducidas de cada partícula de dicha muestra en dicho flujo de fluido envolvente;
- la formación de una gota (9) cargada;
- aislar dicha gota cargada de dicho flujo de fluido envolvente;
- la deflexión de dichas gotas (9) cargadas;
- la clasificación de dicha muestra; y
- 25 la recolección de dicha muestra clasificada, en donde dicha etapa de inyectar al menos una muestra que puede ser irradiada en dicho al menos un fluido envolvente comprende la etapa de inyectar células espermáticas teñidas con Hoechst 33342 en dicho al menos un fluido envolvente y en donde la fuente (12) de radiación es un láser pulsado que suministra de 100 a 500 mW de energía.
- 30 2. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la etapa de dividir dicha radiación en al menos dos haces de luz.
3. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha etapa de dividir dicha radiación en al menos dos haces de luz comprende la etapa de someter dicha muestra que puede ser irradiada con una potencia reducida de radiación que la que fue emitida originalmente desde una fuente de láser.
- 35 4. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 3 en donde dicho paso de someter dicha muestra que puede ser irradiada con una potencia reducida de radiación que la que fue originalmente emitida desde una fuente de láser comprende la etapa de seleccionar dicha potencia reducida de un grupo que consiste de la mitad, un cuarto, y un octavo de dicha potencia emitida originalmente.
- 40 5. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha etapa de detectar una cantidad de dicha fluorescencia emitida desde cada partícula en dicha muestra comprende la etapa de detectar cuantitativamente una cantidad de dicha fluorescencia emitida desde cada partícula en dicha muestra.
- 45

- 5 6. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 5 en donde la etapa de inyectar al menos unas células espermáticas que pueden ser irradiadas en dicho al menos un fluido envolvente y en donde dicha etapa de detectar cuantitativamente una cantidad de dicha fluorescencia emitida desde cada partícula en dicha muestra comprende distinguir entre esperma que contiene al cromosoma X y esperma que contiene al cromosoma Y en donde dicho esperma que contiene al cromosoma X emite una fluorescencia diferente que dicho esperma que contiene al cromosoma Y.
- 10 7. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además la etapa de utilizar un manipulador (21) del haz.
- 15 8. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha etapa de utilizar un manipulador (21) del haz comprende la etapa de utilizar un manipulador del haz seleccionado de un grupo que consiste en espejos, deflectores, divisores del haz, prismas, objetos de refracción, lentes y filtros.
- 20 9. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha etapa de coloración de dicha muestra comprende la etapa de tinción de dicha muestra durante un tiempo de coloración reducido.
- 25 10. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha etapa de tinción durante un tiempo reducido comprende la etapa de teñir dicha muestra durante menos de aproximadamente 40 minutos.
- 30 11. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 9 en donde dicho tiempo de tinción reducido se selecciona de entre un grupo que consiste de
- menos de aproximadamente 35 minutos;
 - menos de aproximadamente 30 minutos;
 - menos de aproximadamente 25 minutos;
 - menos de aproximadamente 20 minutos;
 - menos de aproximadamente 15 minutos;
 - menos de aproximadamente 10 minutos; y
 - menos de aproximadamente 5 minutos.
- 35 12. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha etapa de recolección de dicha muestra clasificada comprende la etapa de recolectar al menos dos poblaciones de partículas de la muestra.
- 40 13. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 12 en donde dicha etapa de recolección de al menos dos poblaciones de partículas de la muestra comprende la etapa de recolección de una población clasificada de esperma que contiene al cromosoma X y la recolección de una población clasificada de esperma que contiene al cromosoma Y.
- 45 14. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 12 en donde dicha etapa de recolección de al menos dos poblaciones de partículas de la muestra comprende la etapa de recolección de dichas poblaciones con una alta velocidad de recolección.
- 50 15. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 14 en donde dicha alta velocidad de recolección se selecciona de entre un grupo que consiste de:
- superior a 2.400 partículas por segundo;
 - superior a 2.600 partículas por segundo;
 - superior a 2.900 partículas por segundo;
 - superior a 3.000 partículas por segundo; y

- superior a 3.100 partículas por segundo.

- 5 16. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha etapa de detectar una cantidad de dicha fluorescencia emitida desde cada partícula en dicha muestra comprende la etapa de detectar a una velocidad de eventos de entre aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 60.000 partículas por segundo.
- 10 17. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha etapa de someter dicha muestra que puede ser irradiada a radiación comprende la etapa de iniciar una rutina de detección.
- 15 18. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el láser pulsado suministra pulsos entre 5 a 20 picosegundos.
- 20 19. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 18 en donde el periodo de emisión de pulsos está entre 0,5 a 20 nanosegundos.
- 25 20. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 19 que comprende además proporcionar una velocidad de repetición entre aproximadamente 2 hasta 10 microsegundos.
- 30 21. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 20 en donde dicha etapa de proporcionar una velocidad de repetición comprende la etapa que proporciona una velocidad de repetición de entre 50-200 MHz.
- 35 22. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha etapa de tinción de dicha muestra con Hoechst 33342 comprende la etapa de teñir mínimamente dichas muestras con Hoechst 33342.
- 40 23. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 22 en donde dicha etapa de teñir mínimamente las muestras con Hoechst 33342 comprende la etapa de permitir que menos colorante se una a dicha muestra.
- 45 24. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, en donde dicha etapa de teñir mínimamente dichas muestras con Hoechst 33342 comprende la etapa de proporcionar un porcentaje de Hoechst 33342 seleccionado de entre el grupo que consiste de aproximadamente el 90%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 70%, y aproximadamente el 60% de una coloración máxima.
- 50 25. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha etapa de inyectar al menos una muestra que puede ser irradiada dentro de dicho al menos un fluido envolvente que comprende inyectar células espermáticas seleccionadas de entre el grupo que consiste de células espermáticas de mamíferos bovinos, células espermáticas de equino, células espermáticas de porcinos, células espermáticas de ovinos, células espermáticas de camélidos, células espermáticas rumiantes, y las células espermáticas canina.
- 55 26. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha etapa de recolectar dicha muestra clasificada comprende la etapa de recolectar dicha muestra clasificada en un recolector, en donde dicho recolector se selecciona de entre el grupo que consiste de múltiples contenedores (32) y un recolector (63) combinado que tiene contenedores (32; 33; 64). individuales
27. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 26 que comprende además la etapa de proporcionar una cantidad de contenedores (32) seleccionados menor que la cantidad de boquillas.
28. Un método de procesamiento de una muestra por citometría de flujo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha etapa de utilizar un láser pulsado comprende la utilización de un láser pulsado seleccionado de entre un grupo que consiste de Nd:YAG y Nd:YVO₄.

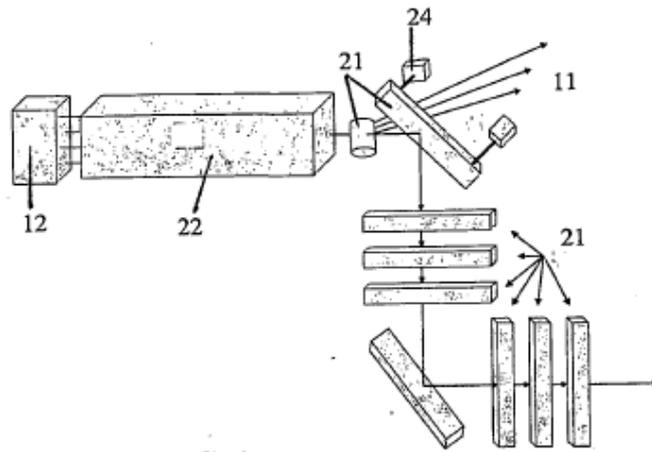


FIG. 1

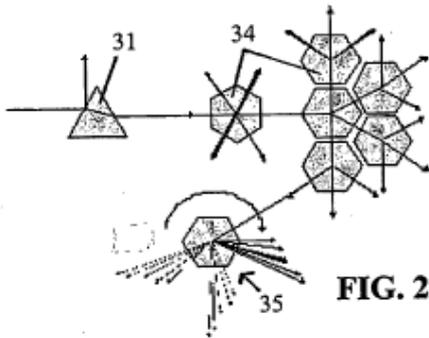


FIG. 2

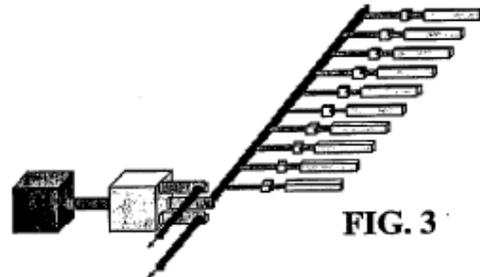


FIG. 3

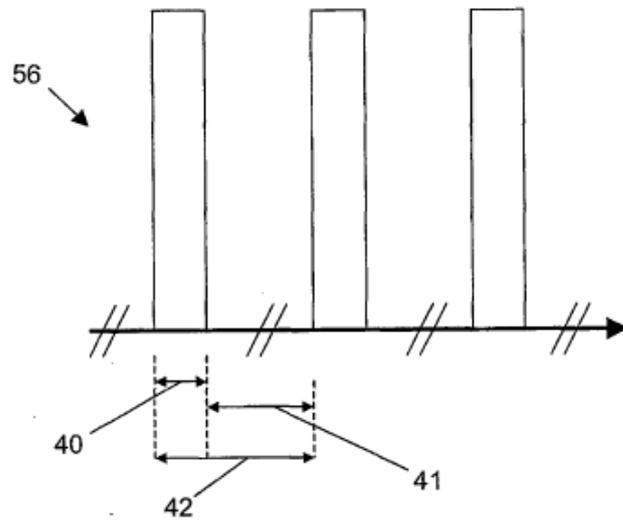


FIG. 4

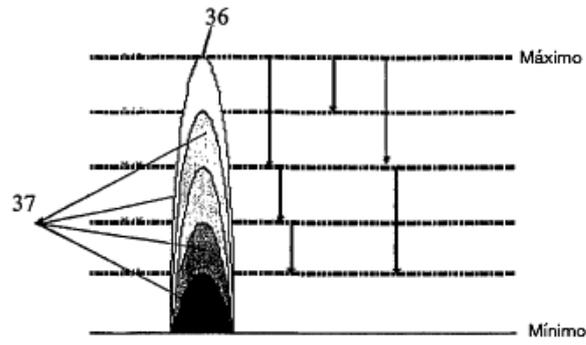


FIG. 5

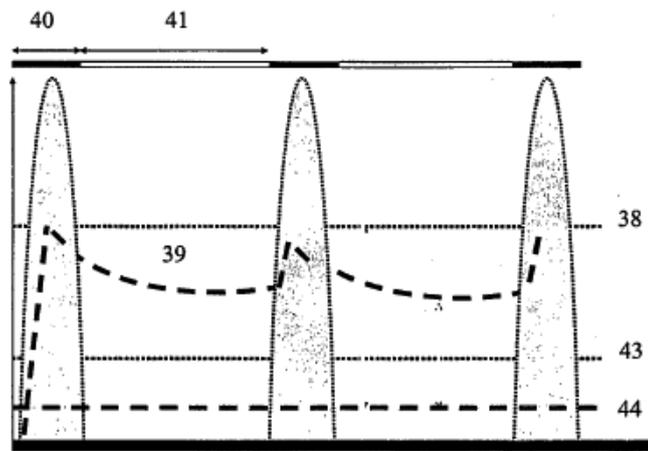


FIG. 6

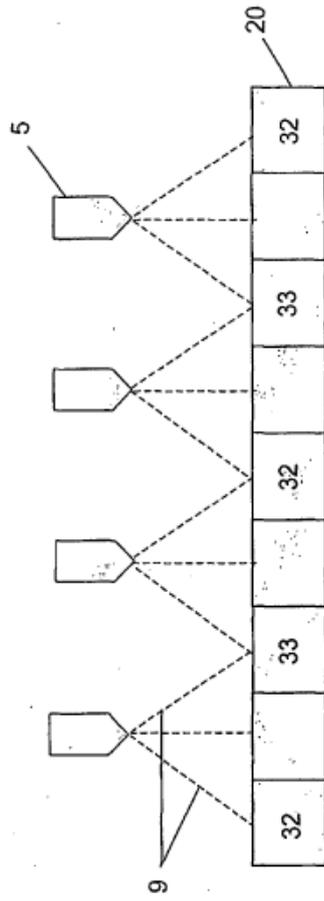


FIG. 7

5/16

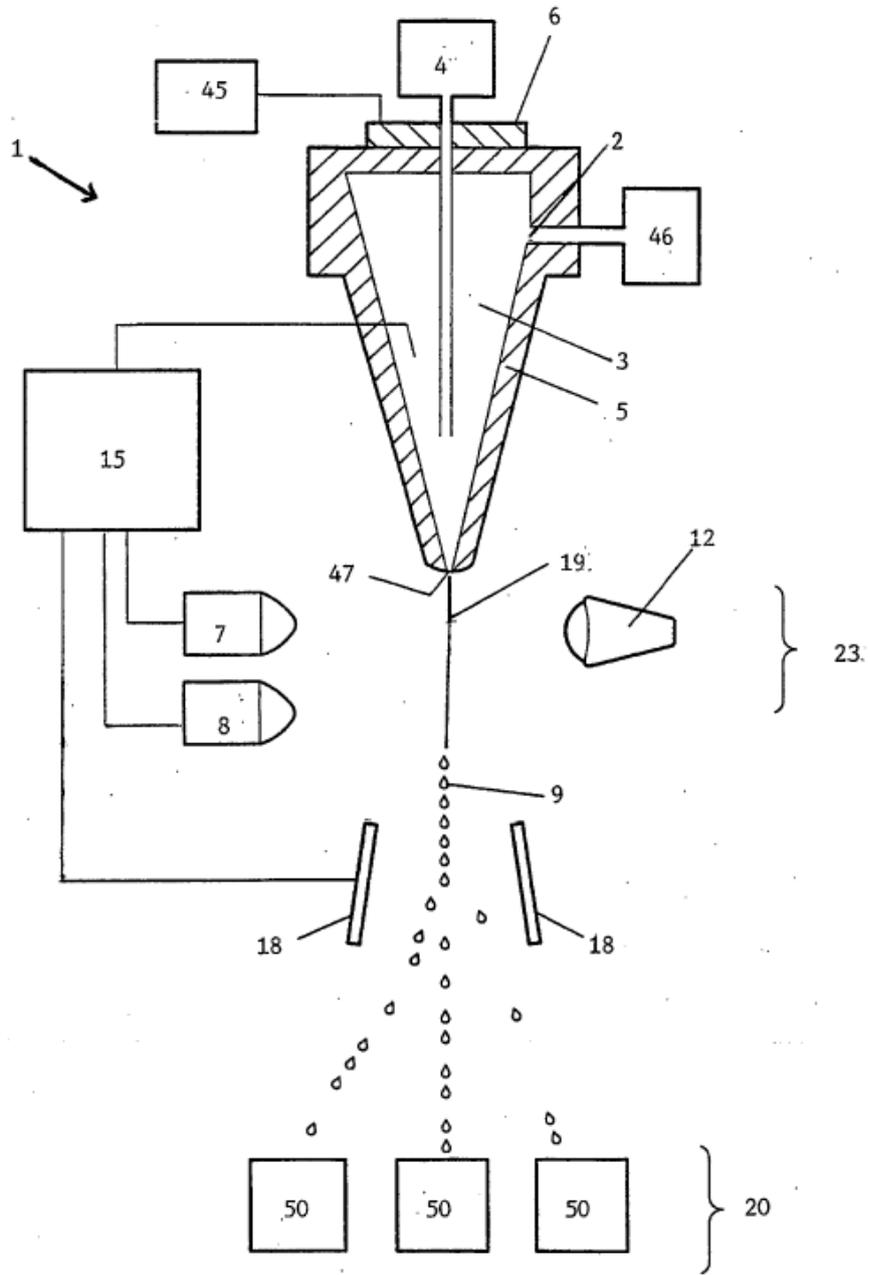


FIG. 8

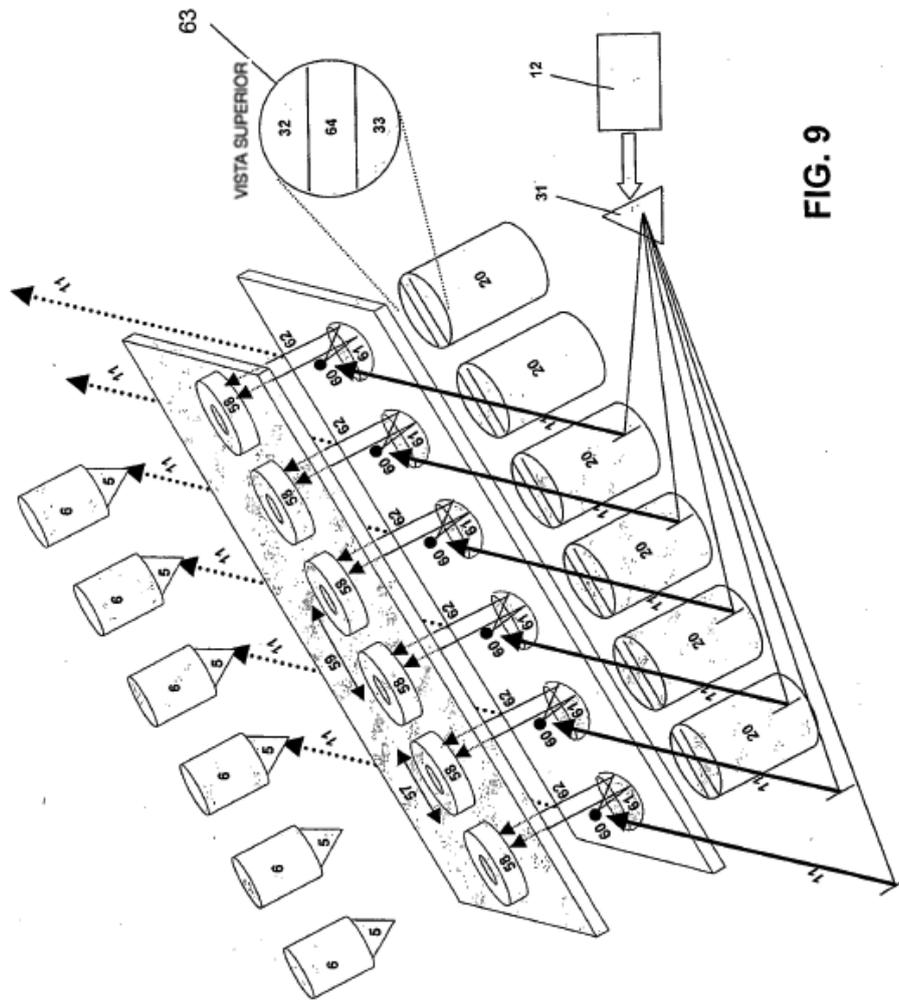


FIG. 9

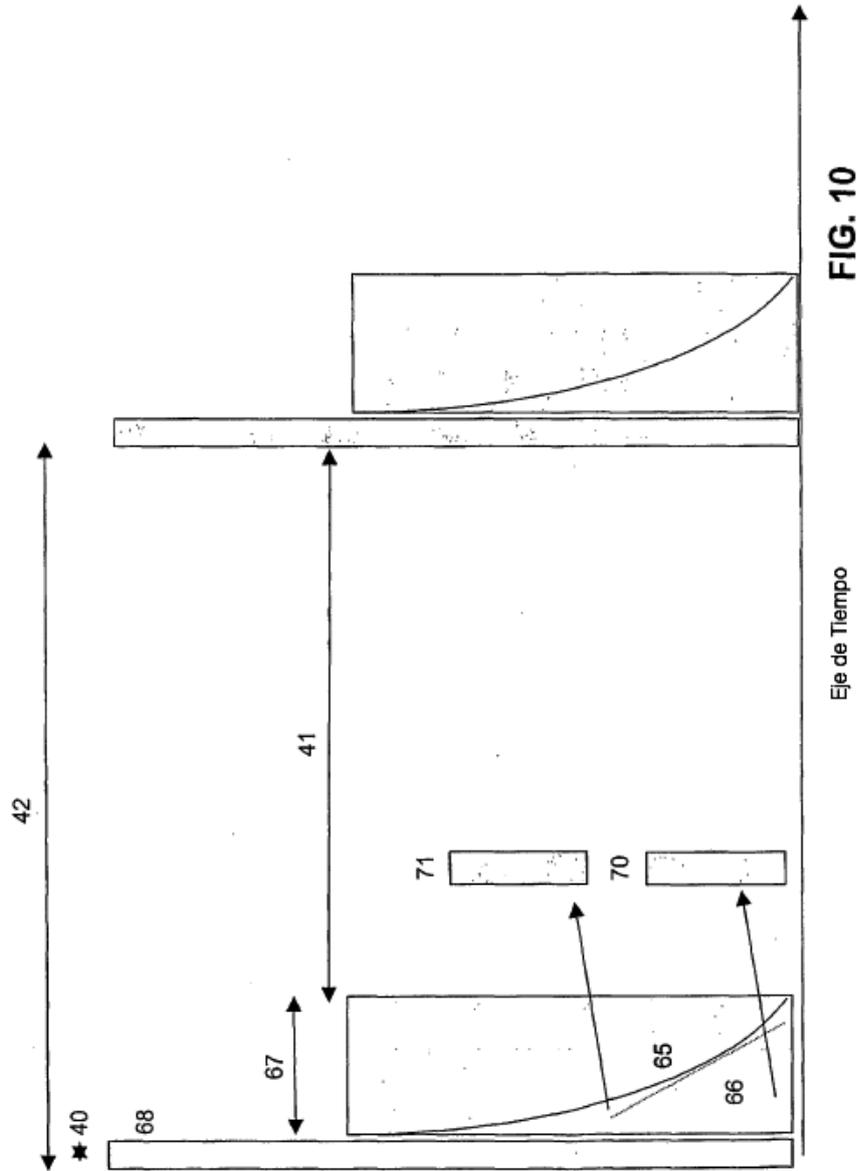


FIG. 10

Eje de Tiempo

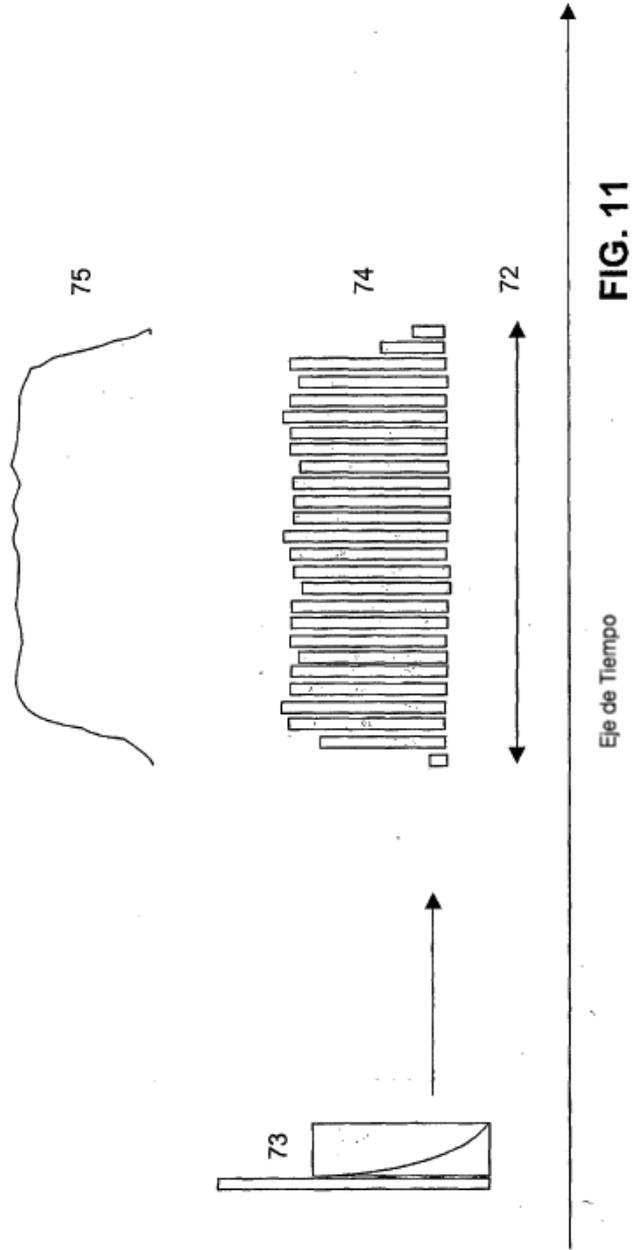


FIG. 11

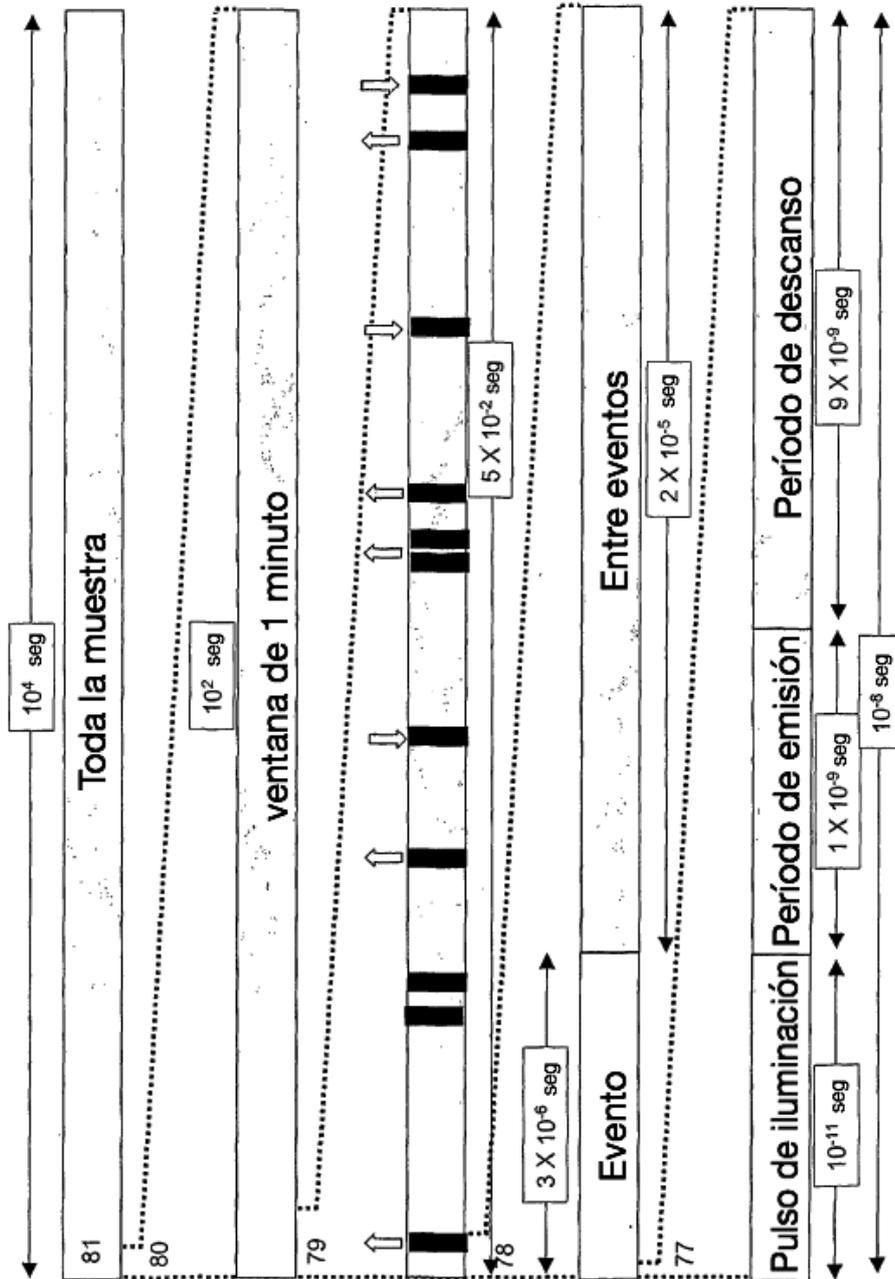


FIG. 12

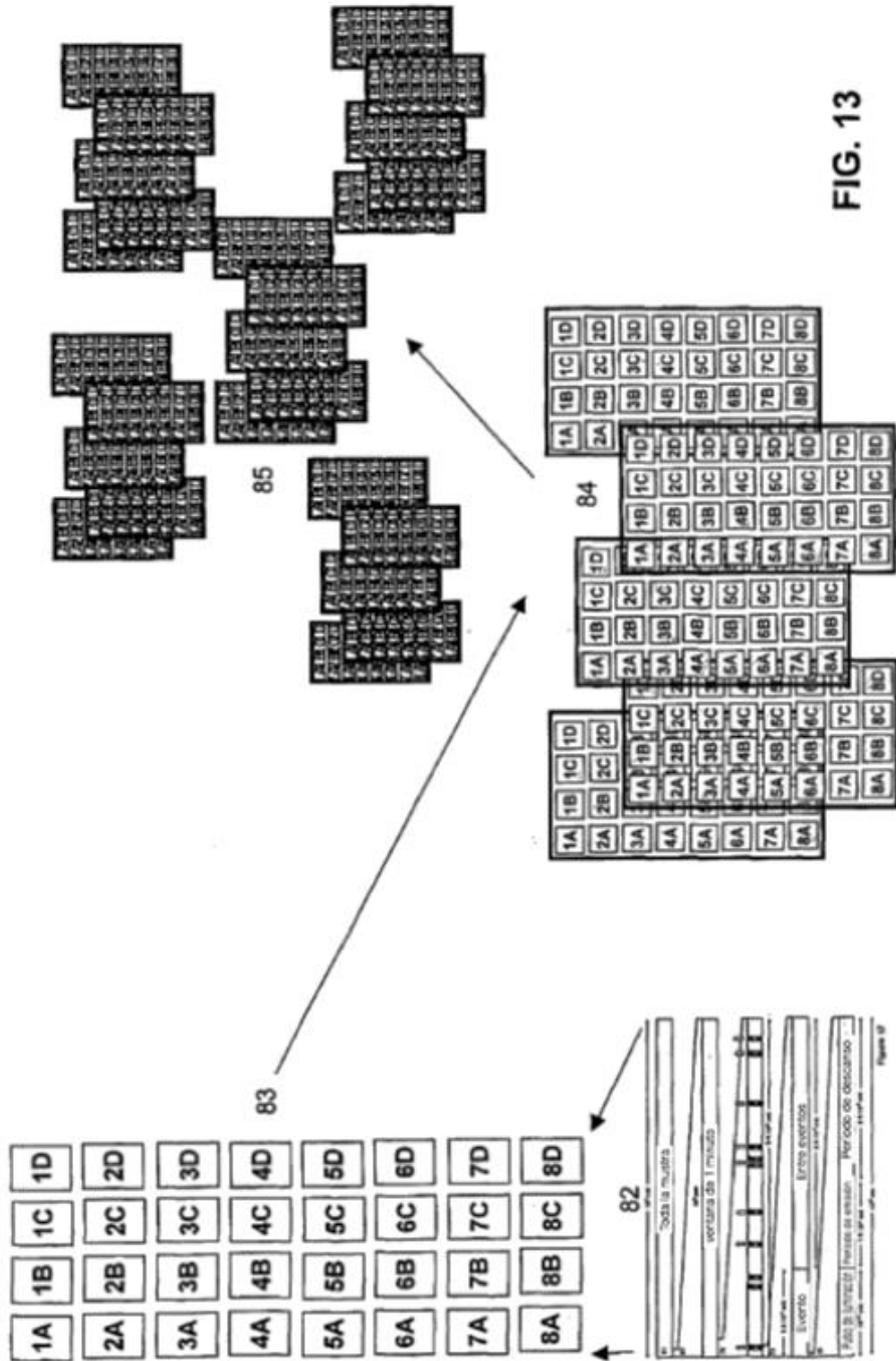


FIG. 13

11/16

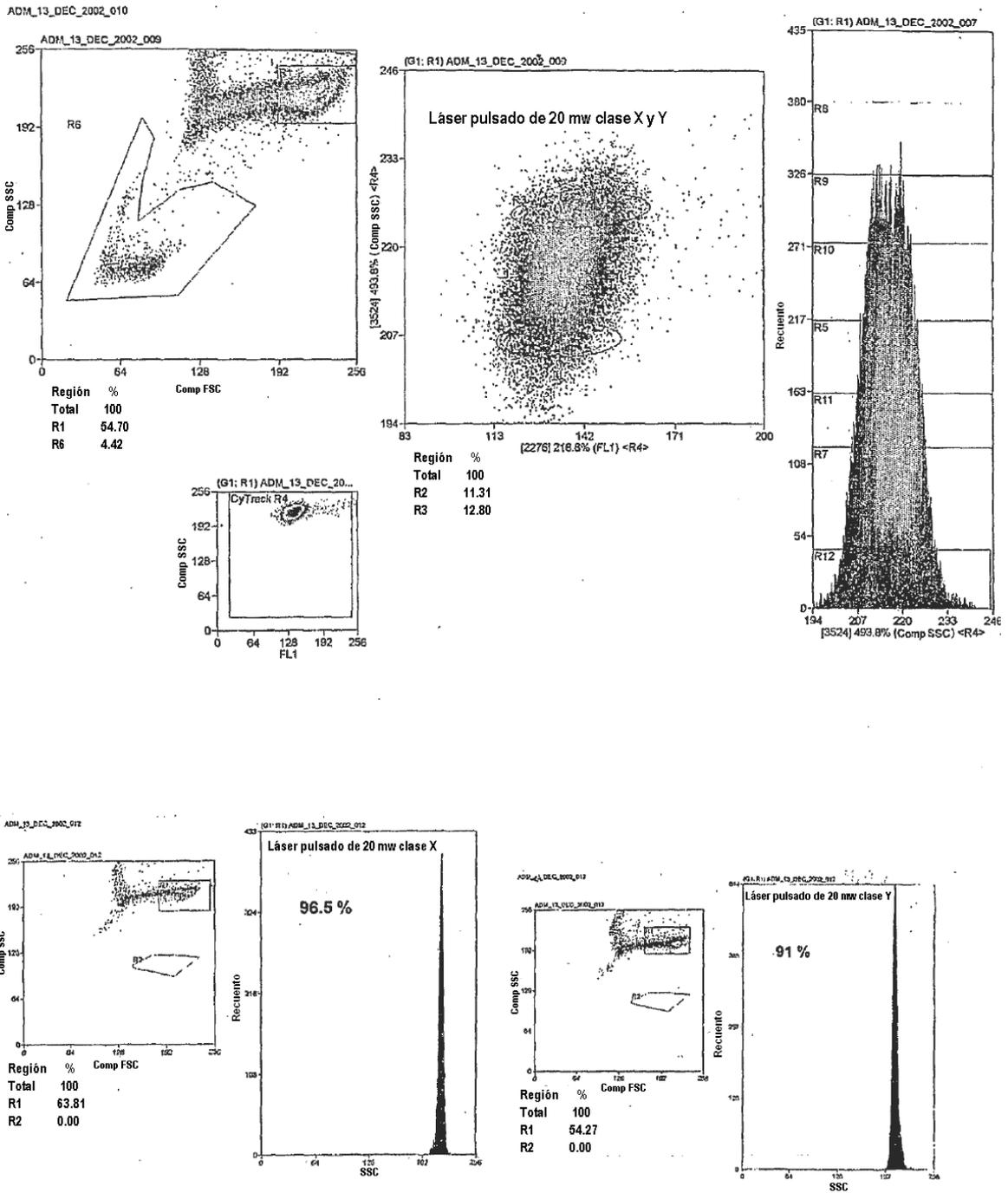


FIG. 14

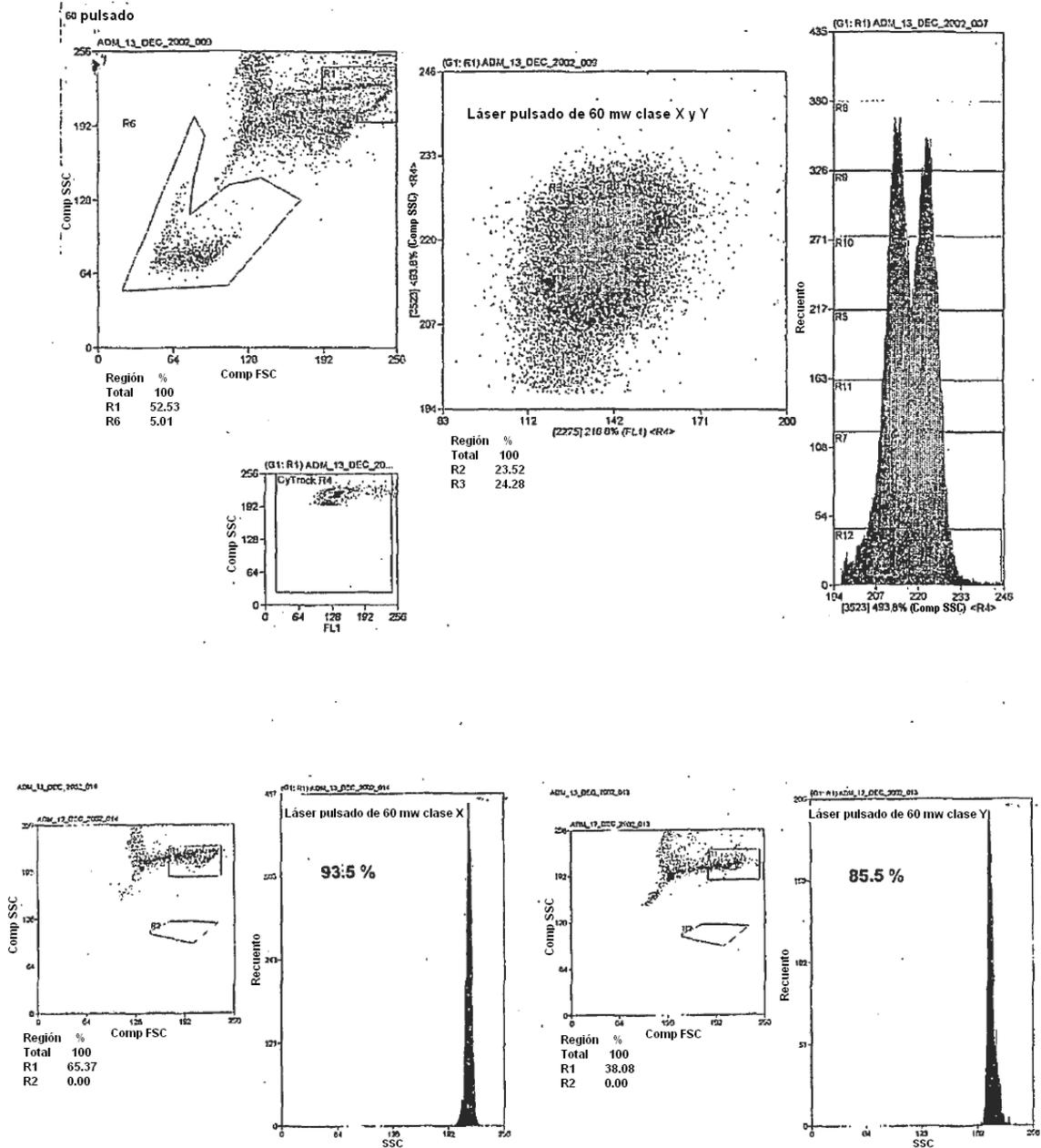


FIG. 15

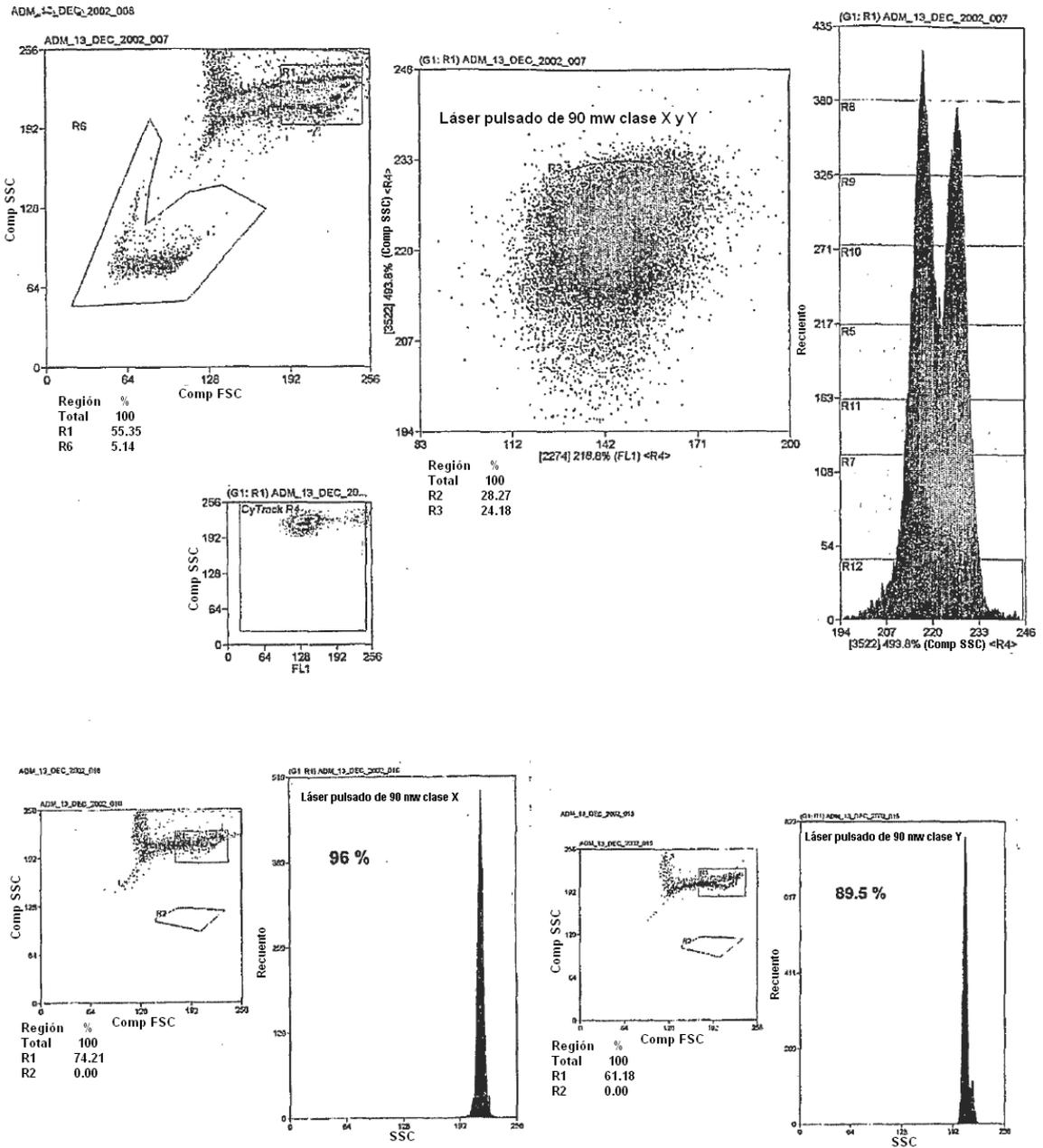


FIG. 16

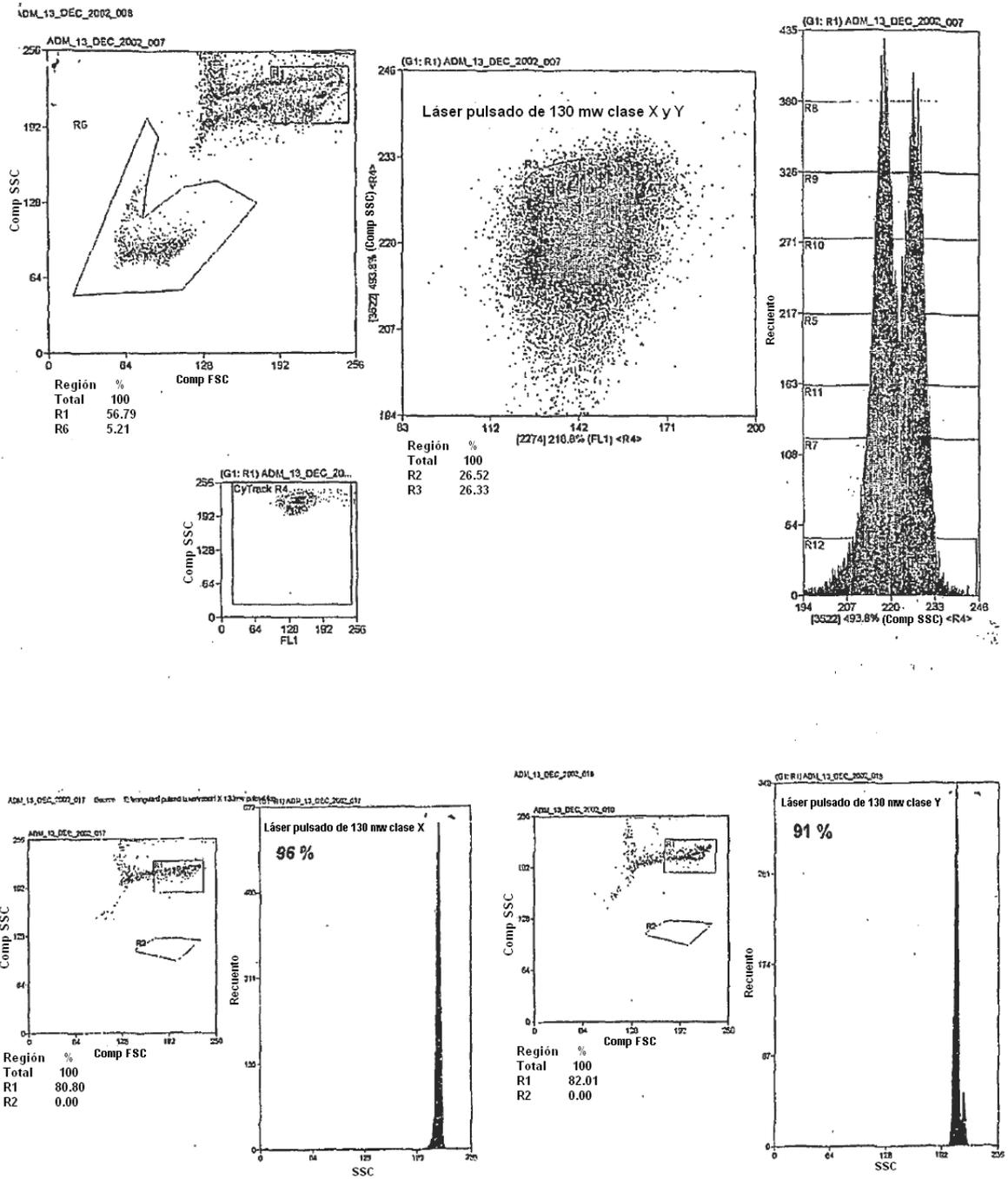


FIG. 17

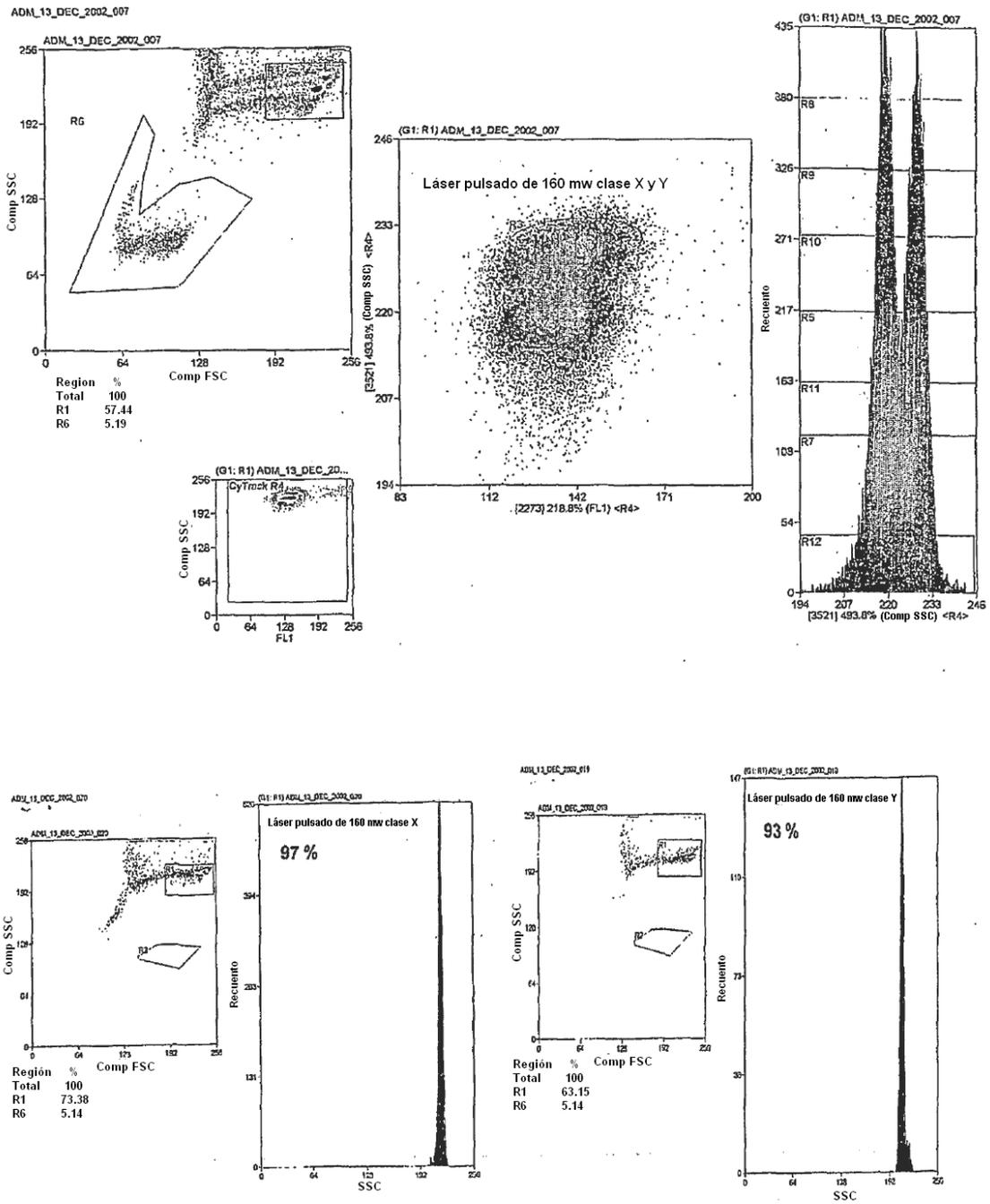


FIG. 18

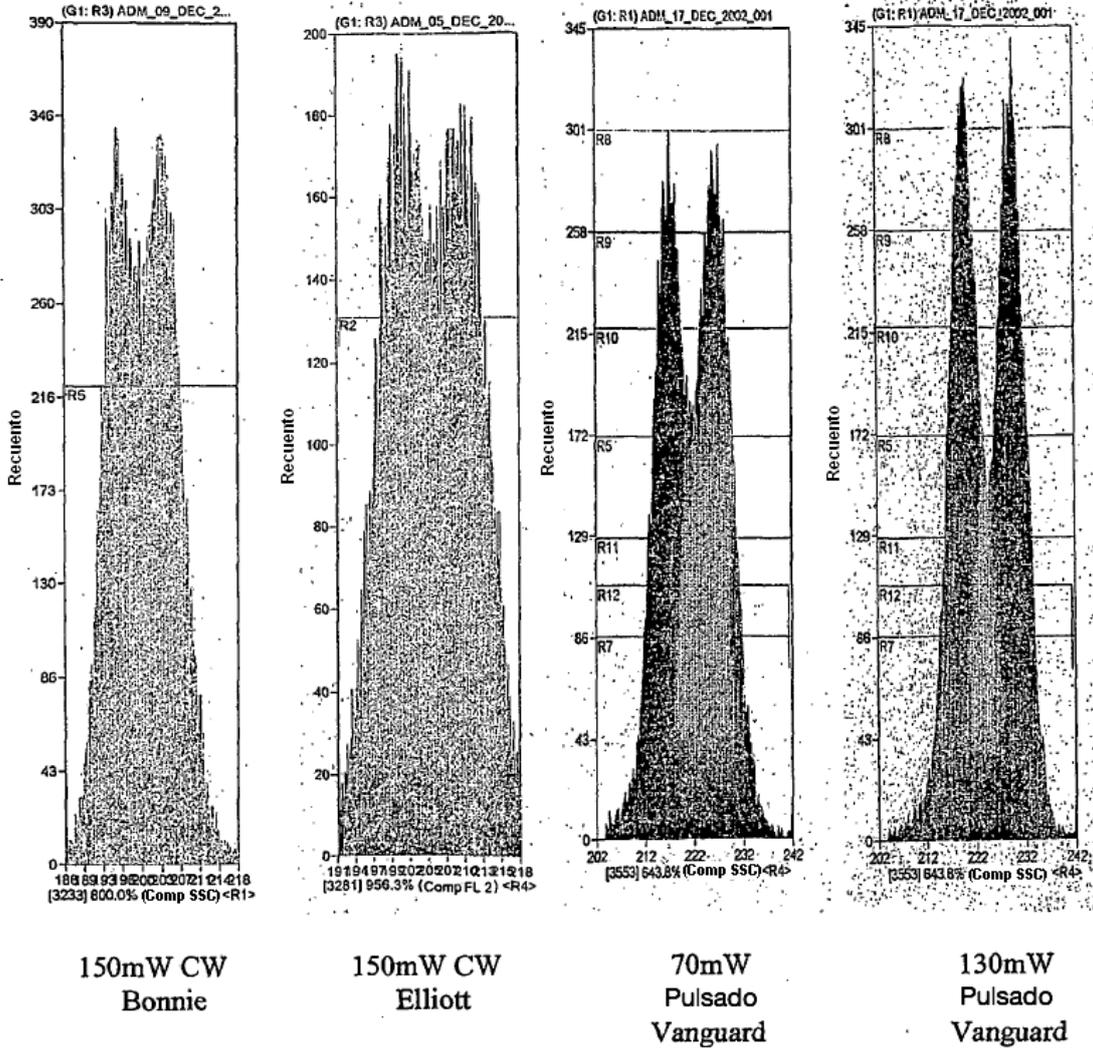


FIG. 19