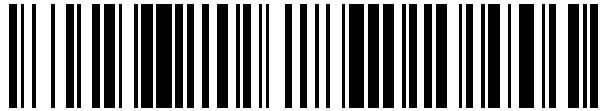


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 099**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2012 E 12167890 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2522983**

54 Título: **Tobera para la alineación de partículas en la corriente de líquido**

30 Prioridad:

12.05.2011 DE 102011075711

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

17.03.2016

73 Titular/es:

**MASTERRIND GMBH (100.0%)
Osterkrug 20
27283 Verden, DE**

72 Inventor/es:

RATH, DETLEF

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 564 099 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

Tobera para la alineación de partículas en la corriente de líquido

5 La presente invención se refiere a una tobera para la alineación de partículas en una corriente de líquido que presenta o se compone de un líquido de corriente de núcleo que contiene partículas dentro de un líquido de corriente envolvente, presentando la tobera un tubo de alimentación para líquido de corriente de núcleo, un citómetro de flujo con la tobera y a un procedimiento para la alineación de partículas en una corriente de líquido, preferentemente un procedimiento para la fabricación de al menos una fracción de las partículas con la etapa de la alineación de las partículas, y de la separación de las partículas en la al menos una fracción y una fracción adicional. Las partículas preferentes que pueden orientarse en una corriente de líquido con la tobera tienen en conjunto forma plana, y son por ejemplo simétricas con respecto a un plano de corte, de manera que las partículas presentan una sección transversal perpendicular a su eje longitudinal con una primera y una segunda dimensión, siendo la sección transversal más pequeña en la primera dimensión que en la segunda dimensión. Las partículas preferentes son células biológicas, por ejemplo células sanguíneas, en particular células en forma de plaquitas, espermatozoides de mamíferos humanos y no humanos, en particular de espermatozoides obtenidos de ganado vacuno macho, cerdo, borrego, elefante, camello o caballo.

Estado de la técnica

20 El documento US 6.149.867 describe una tobera de tipo genérico y un procedimiento con una tobera para la clasificación de espermatozoides de mamíferos en fracciones de espermatozoide específicas de cromosomas sexuales. El procedimiento emplea un citómetro de flujo con una tobera que discurre cónicamente que contiene en su volumen un conducto de admisión para el líquido que contiene espermatozoides, de manera que en la salida de tobera sale una corriente de núcleo que contiene espermatozoides rodeados por una corriente envolvente. La geometría del conducto de admisión para espermatozoides, y en particular la abertura de salida del tubo de alimentación, no se describen con más detalle.

30 El documento WO 99/05504 describe una tobera para el empleo en un citómetro de flujo para la clasificación de espermatozoides, que se caracteriza por que la tobera tiene en la sección entre la abertura de salida de un tubo de alimentación para líquido de corriente de núcleo que contiene espermatozoides una superficie interior que discurre fundamentalmente en forma de embudo, que tiene una primera sección transversal en forma de elipse, y una sección axial adyacente a la misma con sección transversal en forma de elipse, cuyo eje longitudinal está girado 90 °C. El tubo de alimentación tiene una forma cilíndrica y puede estar biselado en la zona de la abertura de salida.

35 El documento EP 1238261 B1 describe una tobera para un citómetro de flujo, en la que un tubo de alimentación dispuesto coaxialmente en una tobera para líquido de corriente de núcleo que contiene espermatozoides discurre desde una sección con diámetro exterior cilíndrico hasta una sección transversal sustancialmente rectangular dentro de una sección de la tobera en forma de cono truncado, uniéndose aguas abajo de este tubo de alimentación una sección de la tobera que se estrecha con sección transversal elíptica. La salida del tubo de alimentación está biselada y tiene en la sección transversal una abertura sustancialmente redonda.

45 El documento US 2004/0095574 A1 describe una célula de flujo con una cánula para la inyección de un líquido de muestra en un canal de líquido para líquido envolvente, cuya sección transversal se estrecha hasta una sección transversal plana de una sección de observación hacia la que está orientada un microscopio. La cánula discurre desde una sección transversal redonda hasta una sección transversal elíptica en su salida que presenta un ancho mayor que la zona de observación del microscopio, por ejemplo 2 mm y una altura de, por ejemplo 50 a 400 µm. El enfoque del líquido de muestra en un plano se realiza, por un lado, a través del estrechamiento del canal de líquido para el líquido envolvente, que está dispuesto aguas abajo de la cánula, y por otro lado a través de velocidades de circulación diferentes de líquido de muestra y líquido envolvente.

50 El documento WO 2009/1516214 A1 describe una tobera para la alineación de partículas en la que un tubo interior para líquido de muestra puede presentar por secciones una sección transversal externa redonda que pasa a una sección transversal externa rectangular en el extremo de salida. La sección transversal interna de este tubo siempre es cilíndrica.

55 El documento US 2004/0050186 A1 describe una tobera que se caracteriza por una superficie interior de entrada adyacente a la salida de tobera con sección transversal elíptica. El tubo de alimentación dispuesto en la tobera puede tener una sección transversal externa rectangular.

60 El documento EP 0288029 A2 describe una cámara de microfluído para el análisis óptico de células que presenta un canal de circulación para líquido envolvente con una salida que se estrecha hacia una sección transversal rectangular, estando situada en el canal de circulación una tobera para líquido de muestra.

65 Kachel et al., The Journal of Histochemistry and Cytometry 774-78 (1977) describen la alineación de partículas en una tobera que presenta, aguas abajo del tubo de alimentación redondo para líquido de corriente de núcleo que

contiene partículas, una sección transversal extendida que se estrecha para la alineación hidrodinámica de las partículas.

Estas toberas conocidas para citómetros de flujo generan a través de la sección transversal elíptica simple o doble de la tobera una alineación de las partículas. Esto se atribuye a un aumento de presión por secciones a través de las dos superficies de toberas enfrentadas, que están dispuestas unas junto a otras más cerca que las superficies de tobera que están situadas en el radio de elipse mayor. Dado que estas relaciones de presión y de corriente asimétricas actúan en la corriente envolvente y la corriente de núcleo dispuesta en la misma, este procedimiento se denomina también alineación hidrodinámica de las partículas.

Objetivo de la invención

Frente al estado de la técnica, la presente invención se basa en el objetivo de facilitar una tobera alternativa para la alineación de partículas, y un procedimiento para la alineación de partículas no rotacionalmente simétricas, en particular espermatozoides de mamíferos, en una corriente de líquido.

Descripción general de la invención

La invención consigue el objetivo mediante una tobera de acuerdo con la reivindicación 1, y un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en particular mediante una tobera, en la que un tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo con su boca desemboca en una tobera, y preferentemente tobera y tubito de alimentación están dispuestos en un eje común, de manera que el tubito de alimentación puede designarse también discurrendo coaxialmente respecto a la tobera, presenta opcionalmente en su volumen interior y en perpendicular a su eje longitudinal una sección transversal que se expande desde una primera y una segunda dimensión, siendo la sección transversal en la primera dimensión menor que en la segunda dimensión, de manera que el tubito de alimentación al menos en una sección adyacente a su boca presenta una sección transversal interna extendida, no rotacionalmente simétrica. La sección adyacente a la boca del tubito de alimentación se extiende por toda la longitud del tubito de alimentación que está dispuesto dentro de la tobera, en particular por la sección del tubito de alimentación entre el primer extremo de la tobera que está situada en frente de su abertura de salida, y su boca. El tubito de alimentación termina en una boca que está dispuesta a una distancia con respecto a la abertura de salida de la tobera, de manera que el líquido de corriente de núcleo que sale de la boca del tubito de alimentación se rodea de líquido de corriente envolvente, se acelera y se extiende a través de la sección transversal interna que discurre hacia la abertura de salida y sale de la abertura de salida. De acuerdo con la invención, la alineación de las partículas se provoca por la sección transversal interna del tubito de alimentación extendida en una dimensión. En la sección de la tobera que se une a la boca del tubito de alimentación hasta su abertura de salida, el líquido de corriente de núcleo que sale del tubito de alimentación contacta con las partículas de líquido de fluido envolvente contenidas en el mismo. Dado que las partículas, debido a su paso a través del tubito de alimentación presentan una alineación constante con respecto a la sección transversal interna del tubito de alimentación, o bien con respecto a su forma plana, en el uso de la tobera mediante una velocidad del líquido de corriente envolvente más alta frente al líquido de corriente de núcleo se realiza un distanciamiento de las partículas unas de otras, contribuyendo solo adicionalmente a la alineación una alineación hidrodinámica a través de un gradiente de presión lateral sobre el líquido de corriente de núcleo, que se genera por una tobera elíptica. De manera preferente, la tobera está instalada de manera que no aparece un gradiente de presión que actúa lateralmente sobre el líquido de corriente de núcleo, por ejemplo mediante una forma rotacionalmente simétrica de la sección de la tobera, al menos entre la boca del tubito de alimentación y la abertura de salida de la tobera.

La sección transversal interna del tubito de alimentación de la tobera de acuerdo con la invención permite una alineación de las partículas, por ejemplo con su separación siguiente en fracciones, preferentemente a velocidades o bien tasas de clasificación altas, dado que la aceleración del líquido de corriente de núcleo a través de una velocidad más alta lleva sustancialmente solo a la aceleración a lo largo del eje de tobera, sin modificar de manera significativa la uniformidad de la alineación de las partículas tras la salida del tubito de alimentación. A diferencia de ello, en el caso de toberas convencionales con tubitos de alimentación rotacionalmente simétricos, y en el caso de una tobera elíptica simple o doble en la sección de tobera entre boca del tubito de alimentación y abertura de salida de la tobera, las velocidades más altas del líquido de corriente envolvente llevan a la modificación del gradiente de presión lateral sobre el líquido de corriente de núcleo, y por lo tanto a alineación de las partículas exclusivamente hidrodinámica. Por lo tanto, en el caso de toberas convencionales una velocidad más alta lleva a una alineación menos uniforme de las partículas, mientras que se consigue una buena alineación a velocidades bajas. Para los propósitos de la invención, el tubito de alimentación puede ser un canal cerrado de manera extensa y puede denominarse como tal.

La tobera de acuerdo con la invención puede presentar una sección transversal interna elíptica simple o doble y es preferentemente rotacionalmente simétrica, es decir con sección transversal interior de entrada, redonda, dado que la alineación de las partículas se realiza dentro del tubito de alimentación que forma la corriente de núcleo. Dado que la alineación de las partículas se realiza solo en la corriente de núcleo, es decir sin contacto con el líquido de corriente envolvente, el procedimiento de acuerdo con la invención puede denominarse también alineación mecánica de las partículas. Se supone que las partículas se orientan en la sección transversal del tubito de alimentación

extendida en una dimensión porque en el paso del tubito de alimentación con el líquido de corriente de núcleo que contiene partículas se configura una corriente laminar con un gradiente de velocidad que orienta las partículas.

En general la invención se refiere a una tobera de acuerdo con la reivindicación 1 para la alineación de partículas para un citómetro de flujo con un primer extremo y un segundo extremo enfrentado, y un tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo, dispuesto en el volumen interior de la tobera que está dispuesto coaxialmente en la tobera en una sección adyacente a su boca, presentando el tubito de alimentación una primera abertura de entrada para líquido de corriente de núcleo y un orificio que está distanciado con respecto a una abertura de salida dispuesta en el segundo extremo de la tobera, y presentando la tobera una segunda abertura de entrada para líquido de corriente envolvente, siendo la sección transversal interna del tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo al menos en una sección adyacente a su boca en una primera dimensión más pequeña que en una segunda dimensión. Preferentemente, el tubito de alimentación presenta una sección transversal interna rectangular cuya extensión longitudinal está situada en la segunda dimensión, en particular, el tubito de alimentación presenta una sección transversal interna ovalada, cuya extensión longitudinal está situada en la segunda dimensión. En particular, la primera dimensión es más pequeña en al menos el factor 0,3 a 0,9 que la segunda dimensión. La tobera puede presentar una conexión eléctrica que se adentra en el volumen interior de la tobera. Preferentemente, la tobera presenta un cristal piezoeléctrico en una distancia con respecto al primer extremo de la tobera en una pared que cierra la sección transversal de la tobera excepto el tubito de alimentación, de manera que la tobera está instalada para la generación de una corriente de gotitas.

La tobera de acuerdo con la invención puede dividirse en cuatro secciones I, II, III y IV. La sección I comprende el primer extremo de la tobera que se forma por un elemento de sujeción, y puede adoptar sustancialmente una forma cilíndrica, cúbica, en forma de paralelepípedo o prismática. La sección II está situada entre sección I y sección III y presenta una forma entrante con sección transversal interna elíptica, o con una sección transversal interna rotacionalmente simétrica, en particular con forma de cilindro rotacionalmente simétrica o forma de cono truncado. Preferentemente, la sección transversal interna en la sección II es una sección transversal interna rectangular que disminuye hacia la abertura de salida de tobera o una sección transversal interna de simetría puntual con respecto al eje longitudinal del tubito de alimentación, en cuyo volumen interior discurre el tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo, preferentemente de manera coaxial. La sección transversal interna de la sección II puede delimitarse por ejemplo mediante un soporte y una tapa paralela al mismo que son preferentemente planos y abarcan el tubito de alimentación. En esta forma de realización, el soporte y tapa forman entre el tubito de alimentación y paredes, que están distanciadas por el tubito de alimentación y unen soporte y tapa, la sección transversal interna para líquido envolvente. El volumen interno de la tobera en la sección II comprende en esta forma de realización el tubito de alimentación y se carga con el procedimiento de acuerdo con la invención sustancialmente de líquido de corriente envolvente. La sección III está dispuesta entre sección II y sección IV y presenta preferentemente una sección transversal interna simétrica con respecto al eje longitudinal del tubito de alimentación, por ejemplo una sección transversal interna rotacionalmente simétrica por completo o una sección dispuesta, entre un soporte y una tapa enfrentada, que están dispuestos en una distancia en paralelo al eje longitudinal del tubito de alimentación, de una forma rotacionalmente simétrica, preferentemente cilíndrica que se forma sustancialmente por la sección dirigida al primer extremo de la tobera de un inserto de tobera dispuesto en el segundo extremo de la tobera. La sección III puede presentar, por ejemplo, una sección transversal interna rotacionalmente simétrica por completo, por ejemplo en forma de cono truncado con tubito de alimentación coaxial o una sección transversal interna de dos secciones distanciadas a través del tubito de alimentación con sección transversal rectangular en cada caso, que forman una sección de la sección transversal interna rotacionalmente simétrica por completo, pudiendo estrecharse la sección transversal interna en dirección a la sección IV. Las secciones con sección transversal rectangular en cada caso pueden estar formadas entre el soporte y la tapa, y estar limitadas en una distancia a ambos lados con respecto al tubito de alimentación a través de las paredes de la tobera. En el interior de la sección III de la tobera, discurre preferentemente coaxial respecto a la tobera el tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo, cuya boca está dispuesta en el extremo de la sección III dirigido al segundo extremo de la tobera. Esta sección III puede presentar, por ejemplo, para la alineación de espermatozoides de mamíferos no humanos una longitud de 1 a 200 mm, preferentemente de 5 a 100 mm, o hasta 50 o hasta 20 mm.

La sección IV se encuentra en el segundo extremo de la tobera, se estrecha hacia la abertura de salida dispuesta en el segundo extremo de la tobera y está configurada opcionalmente rotacionalmente simétrica, preferentemente en forma de cono o en forma de cono truncado o puede presentar una sección transversal rectangular que se reduce hacia la abertura de salida de la tobera. La sección IV puede estar formada entre un soporte y una tapa distanciada del mismo que pueden ser planos en cada caso, y estar limitada a través de las paredes de la tobera que se extienden entre soporte y tapa. En general, la abertura de salida de la tobera es preferentemente circular. La sección IV puede presentar una sección transversal rectangular y pasa preferentemente a una sección transversal circular que forma la abertura de salida de la tobera.

Opcionalmente la sección II y/o la sección III se omiten, de manera que la tobera se compone el tubito de alimentación que está dispuesto en una sección adyacente a su boca de manera coaxial en una tobera que limita con la boca del tubito de alimentación, presentado la tobera una segunda abertura de entrada para líquido de corriente envolvente, y comprendiendo la tobera entre su abertura de salida y la boca del tubito de alimentación una sección transversal interna que se estrecha preferentemente hacia la abertura de salida. En esta forma de

realización, la tobera a lo largo de su eje longitudinal y/o a lo largo del eje longitudinal del tubito de alimentación está delimitada en la sección entre la abertura de salida de la tobera y la boca del tubito de alimentación, por ejemplo a través de una pared que se extiende adyacente a la boca. Una pared de este tipo, que forma por ejemplo el primer extremo de la tobera puede extenderse de manera plana, convexa o cóncava en particular con sección transversal parabólica alrededor del tubito de alimentación, y por ejemplo limitan con una pared de tobera en forma de cono o con soporte y tapa distanciados del eje del tubito de alimentación con paredes dispuestas entre estos, que expanden el volumen interno de la tobera, pudiendo estar dispuesta en la pared una segunda abertura de entrada para líquido de corriente envolvente en la pared. La segunda abertura de entrada está instalada en particular hacia la entrada laminar de líquido de corriente envolvente, por ejemplo como abertura de entrada de un conducto para líquido de corriente envolvente, cuyo eje longitudinal está dispuesto en paralelo al eje longitudinal del tubito de alimentación, y/o como abertura de entrada que está situada en paralelo respecto a la boca del tubito de alimentación y/o en el plano de la boca del tubito de alimentación. La tobera puede presentar en particular una sección transversal interna, como se describe para cada forma de realización para la sección de la tobera entre boca del tubito de alimentación y abertura de salida, por ejemplo con respecto a la sección IV.

Las secciones individuales pueden estar configuradas de manera integral o estar soldadas entre sí, o estar unidas entre sí de manera separable, estar atornilladas entre sí por ejemplo mediante roscas para que pueda realizarse una limpieza sencilla de las partes individuales.

De manera preferente, las secciones I, II y III tienen un eje longitudinal común sobre el que discurre el tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo.

La tobera de acuerdo con la invención presenta una sección transversal interna a lo largo de un eje longitudinal que une un primer extremo con un segundo extremo. La sección transversal interna disminuye en este caso por la superficie continuamente desde el primer al segundo extremo de la tobera, independientemente de su forma, pudiendo permanecer constante por secciones. La sección I de la tobera se forma sustancialmente por un elemento de sujeción, en el que una primera abertura de entrada está empotrada para líquido de corriente de núcleo que se forma por el tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo, de manera que las partículas contenidas en el líquido de corriente de núcleo pueden bombearse directamente hacia el tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo. El tubito de alimentación une el primer extremo de la tobera a lo largo del eje longitudinal de la tobera con un segundo extremo enfrente de la tobera.

El tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo presenta una sección externa en perpendicular a su eje longitudinal y una sección transversal interna que están expandidas en cada caso en una primera y una segunda dimensión. La primera dimensión de la sección transversal interna del tubito de alimentación para el líquido de corriente de núcleo que contiene partículas tiene en este caso una dimensión más reducida que en la segunda dimensión, de manera que la superficie de sección transversal interna del tubito de alimentación está extendida. En una forma de realización preferente, la sección transversal interna en la primera dimensión es al menos en el factor 0,2 a 0,8 menor que en la segunda dimensión. Esta sección transversal interna extendida a lo largo de la segunda dimensión tiene la ventaja de que ya se alcanza hasta la boca del tubito de alimentación una alineación de las partículas. Este efecto aumenta con una diferencia en cuanto a la cantidad de la primera y de la segunda dimensión que expande la sección transversal interna del tubito de alimentación, de manera que la sección transversal interna preferentemente en la primera dimensión es al menos en el factor 0,3 a 0,9 preferentemente al menos en un factor de 0,5 a 0,8 menor que en la segunda dimensión.

Las partículas o células que pasan por el tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo experimentan a través de la geometría de la superficie interna del tubito de alimentación en cada caso la misma alineación hacia el tubito de alimentación, manteniéndose esta alineación tras la salida de líquido de corriente de núcleo que contiene partículas desde la boca del tubito de alimentación a través de la sección entre la boca del tubito de alimentación y la abertura de salida de la tobera. Para la mejor alineación se prefiere que el factor desde la primera hacia la segunda dimensión de la sección transversal a través de las partículas a lo largo de su eje longitudinal sea igual al factor de la primera hacia la segunda dimensión que expanden la sección transversal interna a través del tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo.

En una primera forma de realización, la sección transversal interna del tubito de alimentación es elíptica, en una segunda forma de realización, rectangular. Una sección transversal interna rectangular, puede ascender por ejemplo en la primera dimensión de 50 μm a 200 μm , preferentemente de 50 a 150 μm , y en la segunda dimensión de 75 μm a 300 μm , preferentemente hasta 200 μm . En el caso de una sección transversal interna elíptica, el diámetro pequeño que está en la primera dimensión, puede ascender de 50 μm a 200 μm , preferentemente de 50 a 150 μm , y el diámetro grande que está en la segunda dimensión puede ascender de 75 μm a 300 μm , preferentemente hasta 200 μm .

El espesor de pared del tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo puede ser constante por toda la longitud, aumentar desde el primer al segundo extremo de la tobera o disminuir del primer al segundo extremo de la tobera.

La sección transversal externa del tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo se expande en

perpendicular al eje longitudinal del tubito de alimentación desde una primera y una segunda dimensión, que están preferentemente expandidas en paralelo a la primera o bien a la segunda dimensión de la sección transversal interna, siendo la sección transversal externa también en su primera dimensión menor que en su segunda dimensión. La primera y la segunda dimensión que expanden la sección transversal externa del tubito de alimentación pueden ser en este caso alternativamente de tamaños diferentes o adoptar valores idénticos, de manera que la sección transversal externa sucesivamente puede ser redonda o extendida independientemente de la geometría de la sección transversal interna.

La sección transversal interna expandida en perpendicular al eje longitudinal del tubito de alimentación puede reducirse desde el primer extremo de la tobera hacia el segundo extremo de la tobera a lo largo del canal de circulación, o permanecer constante. En una forma de realización preferente, la sección transversal interna es constante por toda la longitud del tubito de alimentación. En formas de realización en las que la sección transversal interna se reduce, se prefiere que la relación de la primera con respecto a la segunda dimensión, que expanden la sección transversal interna, permanezca aproximadamente constante.

También la sección transversal externa puede reducirse o permanecer constante a lo largo del canal de circulación. En una forma de realización preferente, la sección transversal externa se estrecha por la longitud del tubito de alimentación, preferentemente con espesor de pared constante por la longitud.

El tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo puede ser opcionalmente eléctricamente conductor para transmitir un impulso eléctrico al líquido de corriente de núcleo.

En el elemento de sujeción está dispuesta una segunda abertura de entrada para líquido envolvente conectada a una alimentación de líquido envolvente. La segunda abertura de entrada está empotrada preferentemente en el elemento de sujeción y dispuesta preferentemente más cerca en el primer extremo de la tobera que en el segundo extremo de la tobera, por ejemplo en el revestimiento o bien en una pared del elemento de sujeción. Mediante el conducto de admisión del líquido envolvente a la tobera el líquido envolvente reviste el tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo el menos en la sección IV, que está dirigida al segundo extremo de la tobera. Preferentemente la sección IV para líquido envolvente se estrecha en forma de cono truncado desde el extremo dirigido al primer extremo de la tobera hacia su extremo dirigido al segundo extremo de la tobera, estando dispuesto el tubito de alimentación en el mismo de manera coaxial.

La sección IV de la tobera puede estar formada por un inserto de tobera que se conecta a la sección III de manera estanca al líquido y preferentemente de manera separable. Tanto la alimentación de líquido envolvente como también el tubito de alimentación desembocan en la sección IV, o bien el inserto de tobera que está dispuesto en el segundo extremo de la tobera y es preferentemente rotacionalmente simétrico. La sección IV o bien el inserto de tobera, en la sección dirigida al segundo extremo de la tobera, presenta o se compone de una sección que se estrecha. La abertura de salida del inserto de tobera que forma la abertura de salida de la tobera está configurada preferentemente circular. La abertura de salida del inserto de tobera que forma la abertura de salida de la tobera está configurada preferentemente circular. La abertura de salida de la tobera es preferentemente más pequeña que la boca del tubito de alimentación. Según una forma de realización preferente, la abertura de salida del inserto de tobera está configurada en perpendicular a su eje longitudinal sustancialmente redonda.

El tubito de alimentación para líquido de corriente de núcleo puede estar fijado en una sección de la tobera enfrente de su abertura de salida, en particular en el elemento de sujeción.

En una forma de realización preferente, el tubito de alimentación se forma por un soporte, dos bloques distanciados dispuestos sobre el soporte, que también pueden denominarse nervios y por una tapa distanciada con respecto al soporte. Preferentemente soporte y tapa son aproximadamente planos y paralelos en cada caso. Los bloques pueden estar configurados de manera integral con el soporte. Entre soporte y tapa están dispuestas paredes en una distancia con respecto a los bloques que forman la pared de la tobera. En este caso, soporte y tapa se extienden a ambos lados del tubito de alimentación hasta las paredes, y forman entre ellos y los bloques y paredes, la sección transversal interna de la tobera, que se extiende alrededor del tubito de alimentación, por ejemplo en sección III y/o sección II de la tobera. La sección IV de la tobera entre la boca del tubito de alimentación y la abertura de salida de la tobera puede estar configurada por paredes dispuestas entre soporte y tapa, o estar configurada por un inserto de tobera que se une a las paredes de manera estanca al líquido y se estrecha con sección transversal interna elíptica o circular hacia la abertura de salida. Tapa y soporte pueden estar dispuestos en la sección en la que delimitan el tubito de alimentación entre los bloques, en la misma, en una mayor o en menor distancia que en la sección en la que se extienden entre los bloques y las paredes, y delimitan la sección transversal interna de la tobera. Las paredes en la sección de la tobera entre la boca del tubito de alimentación y la abertura de salida de la tobera pueden estar aplicadas sobre el soporte y/o la tapa, en particular pueden estar configuradas de manera integral con el soporte y/o la tapa, y opcionalmente el soporte y la tapa se extienden hasta la abertura de salida.

En cada forma de realización, la sección transversal interna de la sección II de la tobera entre el tubito de alimentación y su pared interna distanciada del mismo puede ser constante a lo largo del eje longitudinal de la tobera o estrecharse en la dirección a la abertura de salida de tobera. Preferentemente los bloques presentan superficies

externas dirigidas a la tobera que se estrechan en la dirección a la boca del tubito de alimentación, preferentemente superficies externas que están dispuestas en la sección III, en la que las paredes de la tobera forman una sección transversal que se estrecha hacia la abertura de salida, aproximadamente en paralelo a las paredes de la tobera.

5 En esta forma de realización, la tobera puede presentar o componerse de un soporte y una tapa preferentemente paralela, paredes dispuestas entre estos que delimitan la sección transversal interna de la tobera, y bloques distanciados dispuestos entre soporte y tapa, estando configurada opcionalmente la sección de la tobera entre la boca del tubito de alimentación y la abertura de salida de la tobera por las paredes o por un inserto de tobera que se une a las paredes, al soporte y a la tapa de manera estanca al líquido.

10 La fabricación de una tobera de esta forma de realización puede realizarse mediante disposición, o bien configuración integral de las paredes que delimitan la tobera sobre un soporte, en particular incluyendo la sección de la tobera entre la boca del tubito de alimentación y la abertura de salida de la tobera, mediante disposición o bien configuración integral de los bloques en una distancia entre sí sobre el soporte y/o sobre la tapa, y disposición de soporte y tapa uno contra otra. Dado que las paredes y bloques se extienden en cada caso de manera estanca al líquido entre soporte y tapa, el soporte, tapa y los bloques forman entre ellos el tubito de alimentación. Las paredes forman con las superficies de los bloques dirigidas hacia ellas el canal de circulación para el líquido envolvente. La abertura de salida de la tobera se forma en una distancia desde la boca del tubito de alimentación de las paredes, soporte y tapa. Las paredes de los bloques y la sección del soporte dispuesta en los bloques y/o de la tapa que expanden la sección transversal interna del tubito de alimentación pueden generarse porque de un bloque grande dispuesto sobre el soporte y/o tapa, configurado en particular de manera integral con soporte y/o tapa se retira el material que está dispuesto en la sección transversal interna del tubito de alimentación, por ejemplo mediante fresado o corte láserico del bloque grande a lo largo del eje longitudinal del tubito de alimentación. Alternativamente puede fabricarse una tobera en particular de esta forma de realización mediante fundición por inyección. La abertura de entrada para líquido de corriente envolvente puede estar dispuesta en una pared que une soporte y tapa. Preferentemente al menos un generador de oscilaciones denominado en general cristal piezoeléctrico está dispuesto en o adyacente a una pared o bien elemento de sujeción frente a la abertura de salida de la tobera.

30 Preferentemente, soporte, bloques y tapa, y opcionalmente paredes dispuestas entre soporte y tapa, que forman la sección de la tobera entre la boca del tubito de alimentación y la abertura de salida de la tobera se componen de plástico.

35 El procedimiento de acuerdo con la invención según la reivindicación 15 para el fraccionamiento de partículas, preferentemente para la fabricación de una fracción de partículas, en particular usando la tobera presenta las siguientes etapas:

- facilitar un líquido de corriente de núcleo que contiene partículas,
- facilitar un líquido de corriente envolvente,
- 40 - bombear el líquido de corriente de núcleo que contiene partículas a través de una primera abertura de entrada para líquido de corriente de núcleo de una tobera que preferentemente está empotrada en un elemento de sujeción dispuesto en la tobera,
- bombear el líquido de corriente envolvente a través de una segunda abertura de entrada de la tobera para líquido de corriente envolvente,
- 45 - paso por la tobera de líquido de corriente de núcleo en una corriente de núcleo que presenta una sección transversal en perpendicular a su eje longitudinal que se expande en una primera dimensión y una segunda dimensión, siendo la sección transversal en la primera dimensión más pequeña que en la segunda dimensión por medio del bombeo del líquido de corriente de núcleo a través de un tubito de alimentación que presenta una sección transversal que es más pequeña en una primera dimensión que en una segunda dimensión,
- 50 - paso por la tobera de líquido de corriente envolvente, conduciéndose este a través de un suministro de líquido envolvente que está dispuesto de manera extensa alrededor del tubito de alimentación para líquido de corriente envolvente y siendo coaxial a este, en el que en una sección, que está situada entre la boca del tubito de alimentación y la abertura de salida de la tobera, la corriente de núcleo está comprendida o puede contactarse directamente con corriente envolvente,
- 55 - opcionalmente dejar entrar líquido de corriente de núcleo y líquido de corriente envolvente en un inserto de tobera,
- dejar salir el líquido de corriente de núcleo revestido por líquido de corriente envolvente a través de la abertura de salida de la tobera.
- opcionalmente el procedimiento contiene la etapa de la detección de una propiedad de las partículas y,
- 60 - opcionalmente de manera adicional la etapa del tratamiento (por ejemplo mediante radiación por láser) y/o de la desviación del líquido que contiene partículas en contenedores separados, en función de una propiedad detectada, por ejemplo por medio de un campo eléctrico a través del cual pasa el líquido que contiene partículas tras el sometimiento a una carga eléctrica en función de la propiedad detectada. Preferentemente la tobera se pone a vibrar, por ejemplo mediante excitación de un generador de vibraciones que lleva a la formación de una corriente de gotitas que contienen partículas.

65 Es especialmente preferente el procedimiento para la fabricación de fracciones de espermatozoides clasificadas de

- manera específica de cromosomas sexuales, por ejemplo con la etapa de la detección del cromosoma sexual, directamente o indirectamente a través de la detección del contenido de ADN total, de los espermatozoides de mamíferos que salen de la tobera y desviación de los espermatozoides de mamíferos de acuerdo con el cromosoma sexual detectado en fracciones separadas, tal como se conoce en general, por ejemplo, por el documento US 5,135,759 con carga eléctrica de las gotitas de líquido que contienen espermatozoides que salen de la tobera y su desviación entre placas cargadas, o de acuerdo con el documento WO2010/149739 por medio de desviación de gotitas de líquido que contienen espermatozoides que salen de la tobera por medio de su evaporación superficial mediante radiación de láser.
- 10 El procedimiento puede caracterizarse adicionalmente porque las partículas son espermatozoides de mamíferos no humanos, que tras la salida en gotitas de líquido con líquido de corriente de núcleo y líquido de corriente envolvente se desvían de la abertura de salida de la tobera en fracciones separadas de manera específica del cromosoma sexual, en las que los espermatozoides están enriquecidos con respecto a la presencia de un cromosoma sexual. El procedimiento puede caracterizarse porque se radian gotitas de líquido en función de una señal de detección
- 15 específica del cromosoma sexual que está orientada en una segunda posición hacia la corriente de fluido que está dispuesta en una distancia mayor respecto a la tobera que la primera posición de la corriente de fluido, en la que se detecta una señal específica del cromosoma sexual, absorbiéndose la radiación de láser solo superficialmente por la gotita de líquido, y evaporándose la gotita de líquido solo superficialmente, y acelerándose y desviándose en la dirección opuesta a la evaporación superficial. En particular, la radiación de láser puede focalizarse en la superficie de una de las gotas de líquido para la inducción de una fotodisrupción superficial, y/o la radiación de láser puede presentar una longitud de onda que se absorbe de la gotita de líquido. Alternativamente, el procedimiento puede enriquecer los espermatozoides en fracciones específicas del cromosoma sexual porque se cargan eléctricamente gotitas de líquido en función de una señal de detección específica del cromosoma sexual mediante el sometimiento de la tobera a carga eléctrica, y a continuación se desvían mediante el paso a través de un campo eléctrico en
- 20 fracciones separadas. El procedimiento es preferentemente un procedimiento de fabricación para un preparado de partículas que presentan en perpendicular al eje longitudinal una sección transversal que es más pequeña en una primera dimensión que en una segunda dimensión, que son en particular espermatozoides de mamíferos no humanos, siendo la propiedad detectada la presencia del cromosoma X o del cromosoma Y en un espermatozoide, y el procedimiento del fraccionamiento de los espermatozoides en función de la propiedad detectada en al menos dos
- 25 fracciones diferentes, en particular para la fabricación de una fracción en la que los espermatozoides están enriquecidos con cromosoma X o cromosoma Y, por ejemplo en al menos 90 %, preferentemente en al menos 95%, de manera más preferente en al menos 98% o al menos 99%. El paso por la tobera de líquido de corriente envolvente se realiza preferentemente en la sección III en una sección transversal interna rotacionalmente simétrica o en una sección transversal interna a partir de dos secciones distanciadas a través del tubito de alimentación con sección transversal rectangular en cada caso, pudiendo estrecharse la sección transversal interna entre tubito de alimentación y pared de tobera en la dirección a la sección IV dispuesta entre sección III y la abertura de salida. Las secciones III y IV pueden estar formadas con sección transversal rectangular en cada caso entre un soporte y una tapa que se extienden distanciados a ambos lados y en paralelo al eje longitudinal del líquido de corriente de núcleo, y estar limitadas en una distancia a ambos lados con respecto al tubito de alimentación a través de las paredes de la tobera. En la sección IV que se encuentra en el segundo extremo de la tobera, se estrecha preferentemente la sección transversal del líquido de corriente envolvente hacia la abertura de salida dispuesta en el segundo extremo de la tobera y está configurada opcionalmente rotacionalmente simétrica, preferentemente en forma de cono o bien en forma de cono truncado, o puede presentar una sección transversal rectangular que se reduce hacia la abertura de salida de la tobera. Tal como se ha descrito con referencia a la sección III, la sección IV puede presentar también
- 30 secciones con sección transversal rectangular en cada caso que se extienden a ambos lados del tubito de alimentación y están formadas entre el soporte y la tapa, y están delimitadas en una distancia a ambos lados respecto al tubito de alimentación a través de las paredes de la tobera. En secciones I, II y III el líquido de corriente de núcleo circula a través del tubito de alimentación y entra desde su boca en la sección IV adyacente en la que se rodea directamente por el líquido de corriente envolvente. En las secciones I, II y III, el líquido de corriente envolvente circula preferentemente entre el tubito de alimentación y las paredes de la tobera, y en la sección IV entre el líquido de corriente de núcleo que sale de la boca del tubito de alimentación y de la pared de tobera. El guiado del líquido de corriente de núcleo a través del tubito de alimentación produce una corriente de núcleo, cuya sección transversal es más pequeña en una primera dimensión que en una segunda dimensión, generando esta sección transversal la alineación regular de partículas con sección transversal plana que es más pequeña en una
- 35 primera dimensión que en una segunda dimensión. Preferentemente el líquido de corriente de núcleo, revestido por el líquido de corriente envolvente, que está formado a través de la salida del líquido de corriente de núcleo desde la boca del tubito de alimentación presenta una sección transversal que es más pequeña en una primera dimensión que en una segunda dimensión.
- 40 La sección IV de la tobera puede estar formada por un inserto de tobera. El líquido de corriente de núcleo entra en la sección IV de tobera, o bien en el inserto de tobera, que se une a la boca del tubito de alimentación, sustancialmente como un rayo con la geometría que corresponde a la sección transversal interna del tubito de alimentación. De la abertura de salida del inserto de tobera sale un líquido de corriente de núcleo revestido por líquido de corriente envolvente. En el caso de abertura de salida circular de la tobera, el líquido de corriente envolvente en geometría cilíndrica sale de la abertura de salida. Ya que debido a la alineación de las partículas en el líquido de corriente de núcleo a través de la sección transversal interna extendida del tubito de alimentación la tobera puede presentar una
- 45 50 55 60 65

sección IV simple, rotacionalmente simétrica, en forma de cono truncado. En el líquido de corriente envolvente, el líquido de corriente de núcleo está dispuesto con sección transversal extendida en el que las partículas están orientadas sustancialmente de manera uniforme, por ejemplo con los lados longitudinales de su sección transversal en paralelo a los lados longitudinales de la sección transversal del líquido de corriente de núcleo, y con los lados estrechos de su sección transversal en paralelo a los lados estrechos de la sección transversal del líquido de corriente de núcleo, estando dispuesto preferentemente el eje longitudinal de las partículas, por ejemplo de espermatozoides, en paralelo al eje longitudinal del líquido de corriente de núcleo en el tubito de alimentación.

En una forma de realización preferente, la sección IV de tobera discurre en forma de cono truncado hacia la abertura de salida en el extremo dirigido al segundo extremo de la tobera, mientras que la sección transversal del tubito de alimentación por toda su longitud, al menos en su sección III permanece constante. En particular en el caso de una velocidad de circulación del líquido envolvente en la sección transversal a la altura de la boca del tubito de alimentación, igual o mayor que la velocidad de circulación del líquido de núcleo, de la sección transversal interna de la tobera en la sección IV que disminuye resulta una aceleración del líquido de corriente envolvente con respecto al líquido de corriente de núcleo, por lo que se realiza un aislamiento de partículas del líquido de corriente de núcleo a lo largo del eje longitudinal del inserto de tobera.

En una forma de realización, el líquido de corriente de núcleo se bombea aproximadamente con el mismo caudal hacia la primera abertura de entrada que se bombea el líquido de corriente envolvente hacia la segunda abertura de entrada. Alternativamente, el líquido de corriente de núcleo también puede bombearse con un caudal hacia la primera abertura de entrada, que es mayor o menor que el caudal con el que el líquido de corriente envolvente se bombea hacia la segunda abertura de entrada.

Preferentemente la tobera presenta un generador de vibraciones, por ejemplo un elemento piezoeléctrico que está instalado para generar ondas de presión que discurren en perpendicular al eje longitudinal de la tobera, para generar en la corriente de líquido tras la abertura de salida una corriente de gotas. El generador de vibraciones puede estar instalado, por ejemplo, en una pared en el primer extremo de la tobera, en particular puede estar fundido, como por ejemplo en un elemento de sujeción.

La tobera puede estar dispuesta en un citómetro de flujo que presenta al menos una primera fuente de radiación que está orientada en una primera sección de la corriente de líquido que sale de la abertura de salida, por ejemplo un láser, y un primer detector orientado enfrente de la fuente de radiación hacia la primera sección de la corriente de líquido, generando opcionalmente el detector una señal que activa un dispositivo de desviación para desviar, por ejemplo fraccionar, secciones de la corriente de líquido en función de la detección por medio de la señal. Opcionalmente, una segunda fuente de radiación está orientada por ejemplo hacia una segunda sección de la corriente de líquido entre la primera fuente de radiación y el inserto de tobera, mientras que un segundo detector está orientado en esta segunda sección. Preferentemente el segundo detector genera una segunda señal que controla el dispositivo de desviación para que se desvíen secciones de la corriente de líquido adicionalmente en función de la segunda señal.

La tobera puede presentar una unión de metal y en particular de acero noble para la transmisión de carga, que preferentemente está dispuesta en la sección I de la tobera sobre el soporte a ambos lados del eje longitudinal. La unión de acero noble presenta un contacto eléctrico que puede someter a carga eléctrica al conducto de admisión para líquido de corriente de núcleo y/o al conducto de admisión para líquido de corriente envolvente. Preferentemente, el contacto eléctrico se controla en función de una primera y/o segunda señal que se obtiene a través de medición de las gotitas aisladas por debajo de la abertura de salida. En función de la primera y/o segunda señal se realiza una carga positiva o negativa de las gotitas. De manera correspondiente a su carga, las gotitas pueden desviarse en direcciones diferentes, de manera que se obtienen al menos dos fracciones.

50 Descripción exacta de la invención

La invención se describe ahora de manera más exacta con referencia a las figuras y mediante ejemplos que esquemáticamente muestran

- 55 - en la figura 1 una tobera de acuerdo con la invención en sección transversal,
- en las figuras 2 a 5 cortes a lo largo de la línea A-A en la figura 1,
- en la figura 6 una vista en planta de una forma de realización preferente de la tobera sin tapa,
- en la figura 7 una tapa para la tobera de acuerdo con la figura 6,
- en la figura 8 una vista en planta de una forma de realización preferente adicional de la tobera sin tapa,
- 60 - en la figura 9 una tapa para la tobera de acuerdo con la figura 8, y
- en la figura 10 una forma de realización adicional de la tobera.

En las figuras los mismos números de referencia designan elementos de igual función. La figura 1 muestra una tobera de acuerdo con la invención para la alineación de partículas para un citómetro de flujo con un primer extremo 10 y un segundo extremo 11. En el primer extremo 10 de la tobera se encuentra la sección I que está configurada en este caso cilíndrica, y se forma sustancialmente por un elemento 2 de sujeción, a lo largo de cuyo eje longitudinal

discurre el tubito de alimentación 5 para líquido de corriente de núcleo, y en el que está empotrada una segunda abertura de entrada 4 para líquido de corriente envolvente. La sección adyacente II está dispuesta coaxialmente con respecto a la sección I y se estrecha cónicamente hacia el segundo extremo 11 de la tobera. La sección III cilíndrica adyacente se forma por un inserto de tobera 6 que está dispuesto en el segundo extremo 11 de la tobera. De
 5 manera coaxial a la sección III formada por el inserto de tobera 6 discurre en su volumen interno el tubito de alimentación 5 para líquido de corriente de núcleo. La boca 12 del tubito de alimentación 5 está situada por ejemplo entre sección III y sección IV. La sección IV se forma también por el inserto de tobera 6, tiene forma de cono truncado y se estrecha en la dirección del segundo extremo 11 de la tobera hasta una abertura de salida 7 con
 10 sección transversal redonda.

Una primera abertura de entrada 1 para líquido de corriente de núcleo se encuentra sobre el primer extremo 10 de la tobera y está empotrada en el elemento 2 de sujeción. En la forma de realización mostrada, la primera abertura de
 15 entrada 1 para líquido de corriente de núcleo está empotrada coaxialmente en la sección de forma cilíndrica de la tobera y se forma por el tubito de alimentación 5. Este tubito de alimentación 5 discurre desde el primer extremo 10 de la tobera en la dirección del segundo extremo 11 de la tobera, donde se guía hacia el inserto de tobera 6 y presenta una boca 12 en una distancia respecto a la abertura de salida 7. El tubito de alimentación 5 para líquido de corriente de núcleo y el soporte 2 está dispuestos coaxialmente.

Sobre el elemento 2 de sujeción está dispuesta una segunda abertura de entrada 4 para líquido de corriente envolvente distanciada con respecto a la primera abertura de entrada 1 para líquido de corriente de núcleo. Esta
 20 segunda abertura de entrada 4 se encuentra en la forma de realización mostrada en la pared del elemento 2 de sujeción. A la segunda abertura de entrada 4 está unida un suministro 9 de líquido envolvente que une el elemento 2 de sujeción con el inserto de tobera 6 dispuesto en el segundo extremo 11 de la tobera. El suministro 9 de líquido envolvente está configurado en forma de cono truncado en la zona entre elemento 2 de sujeción e inserto de tobera
 25 6. El tubito de alimentación 5 discurre coaxialmente al suministro 9 de líquido envolvente en su volumen interno.

Tanto el suministro 9 de líquido envolvente como también el tubito de alimentación 5 para líquido de corriente de núcleo desembocan en un inserto de tobera 6 que está dispuesto en el segundo extremo 11 de la tobera. El inserto de tobera 6 presenta de manera adyacente a su abertura de salida 7 que está configurada de forma circular, una
 30 sección que se estrecha. El tubito de alimentación 5 para líquido de corriente de núcleo está dispuesto coaxialmente al inserto de tobera 6, y termina en una distancia con respecto a la abertura de salida 7. El espacio intermedio entre tubito de alimentación 5 y pared del inserto de tobera 6 se llena con líquido de corriente envolvente.

Sobre la tobera, están dispuestos además un cristal piezoeléctrico 3 para generar una corriente de gotitas, así como
 35 una unión 8 de metal o bien acero noble para la transmisión de carga al líquido de corriente envolvente.

La figura 2 muestra un corte a largo de la línea A-A mostrada en la figura 1 y la abertura de salida 7 de la tobera dispuesta en una distancia respecto a la boca 12. La sección transversal interna 5A del tubito de alimentación 5 para
 40 líquido de corriente de núcleo se expande en una primera dimensión y una segunda dimensión que se diferencian de manera notable entre sí en cuanto a la cantidad, en el presente caso por el factor 0,5. De acuerdo con esta forma de realización, la sección transversal interna 5A presenta la forma de un rectángulo. Las otras secciones transversales son sustancialmente circulares.

El suministro 9 de líquido de corriente envolvente llena el espacio entre la pared interna del inserto de tobera 6 y la
 45 pared externa del tubito de alimentación 5 y contacta el líquido de corriente de núcleo en la sección entre la boca 12 y la abertura de salida 7 distanciada.

La figura 3 muestra un corte a lo largo de la línea A-A de la figura 1. La sección transversal interna 5A del tubito de alimentación 5 se expande en una primera dimensión y una segunda dimensión que se diferencian notablemente en
 50 la cantidad, en el presente caso aproximadamente por el factor 0,3. De acuerdo con esta forma de realización, la sección transversal interna 5A presenta la forma de una elipse. La sección transversal 5B externa del tubito de alimentación 5, el inserto de tobera 6, el suministro de líquido envolvente y la abertura de salida 7 dispuesta en una distancia desde la boca 12, presentan una sección transversal circular.

La figura 4 muestra un corte A-A de la figura 1 y la abertura de salida 7 de la tobera dispuesta en una distancia desde la boca 12. La sección transversal interna 5A del tubito de alimentación 5 es, en una primera dimensión,
 55 aproximadamente en el factor 0,3 más pequeña que en una segunda dimensión, y presenta la forma de una elipse. También la sección transversal 5B externa del tubito de alimentación 5 es, en una primera dimensión, más pequeña que en una segunda dimensión, y presenta la forma de una elipse. El eje longitudinal de la sección transversal interna 5A elíptica está situado en paralelo al eje longitudinal de la sección transversal 5B externa elíptica. .

La figura 5 muestra un corte A-A de la figura 1, y la abertura de salida 7 dispuesta en una distancia desde la boca
 60 12. La sección transversal interna 5A del tubito de alimentación 5 tiene la forma de una elipse, y se expande en una primera dimensión y una segunda dimensión, que en el caso presente se diferencian aproximadamente en el factor 0,3. La sección transversal 5B externa presenta igualmente la forma de una elipse y se expande en una primera y una segunda dimensión. Ambas elipsis se disponen de manera que sus ejes longitudinales están en ángulo recto

uno respecto a otro.

En la figura 6 se muestra una forma de realización preferente, en la que la tobera presenta un soporte 13 y dos bloques 14, 15 dispuestos sobre el mismo, que están dispuestos en una distancia uno respecto a otro. Los bloques 14, 15 delimitan con el soporte 13 y una tapa 16 dispuesta frente al soporte 13, que está mostrada en la figura 7, el tubito de alimentación 5. Las superficies del soporte 13 y de la tapa 16 dirigidas unas hacia otras son preferentemente paralelas y planas. El soporte 13 y la tapa 16 pueden estar formados en cada caso en forma de placa.

Las superficies de los bloques 14, 15 enfrentadas al tubito de alimentación 5 forman la parte de la sección transversal 5B externa del tubito de alimentación 5 que delimita con las paredes 17, 18 el trayecto de circulación para el líquido de corriente envolvente. Las paredes 17, 18 pueden ser generalmente paralelas unas hacia otras, y las superficies de los bloques 14, 15, que están dirigidas a las paredes 17, 18, pueden discurrir en paralelo a las paredes. La sección de la tobera entre la boca 12 y la abertura de salida 7 puede estar formada por un inserto de tobera 6 que se une de manera estanca al fluido a las paredes 17, 18. El inserto de tobera 6 puede estar dispuesto de manera correspondiente a la figura 6 por secciones dentro de las paredes 17, 18 o por fuera, estando aplicado de manera preferente en cada caso un saliente 20 sobre la superficie interna de las paredes 17, 18 o bien sobre su superficie externa, extendiéndose el saliente 20 preferentemente por el soporte 13 y la tapa 16. Las paredes 17, 18 están dispuestas sobre el soporte 13.

La tapa 16 se extiende hasta el inserto de tobera 6 dispuesto de manera estanca al líquido.

Opcionalmente, entre paredes 17, 18 y soporte 13, o bien tapa 16, puede estar dispuesta una junta 19. Adicionalmente entre los bloques 14, 15 y la tapa 16 puede estar dispuesta una obturación 19, preferentemente la tapa 16 es plana y presenta una superficie elástica como obturación 19 que se extiende por la parte de su superficie, que está dispuesta contra los lados frontales de las paredes 17, 18 dirigidos hacia la tapa, y por la parte de su superficie que está dispuesta contra los bloques 14, 15, en particular por la superficie completa de la tapa 16 que se extiende por lados frontales de las paredes 17, 18 dirigidos hacia ella.

La figura 8 muestra una forma de realización preferente en general de la tobera, en la que el tubito de alimentación 5 está formado por dos bloques 14, 15 paralelos distanciados entre la superficie plana el soporte 13, y la superficie de la tapa 16 paralela y distanciada plana, en la que se extienden entre soporte 13 y tapa 16 paredes 17, 18 distanciadas hacia los bloques 14, 15, que se estrechan hacia una abertura de salida 7 distanciada desde la boca 12 del tubito de alimentación 5. Tal como se muestra en la figura 8, la sección de la tobera que se estrecha desde la boca 12 del tubito de alimentación 5 hacia la abertura de salida 7 puede formarse por las paredes 17, 18 que se extienden de manera estanca al líquido entre soporte 13 y tapa 6. La segunda abertura de entrada 4 para líquido de corriente envolvente está dispuesta en una de las paredes 17, 18, la primera abertura de entrada 1 para líquido de corriente de núcleo sobre el primer extremo 10 de la tobera. La tapa 16 mostrada en la figura 9 puede delimitar mediante disposición contra las superficies frontales de los bloques 14, 15 y de las paredes 17, 18, en particular con una obturación 19 intercalada, la sección transversal entre tapa 16 y soporte 13, así como entre paredes 17, 18 y bloques 14, 15 respecto a dos secciones transversales internas rectangulares para el líquido envolvente, por ejemplo hasta limitar con un inserto de tobera dispuesto en la sección IV.

La figura 10 muestra una forma de realización en la que la boca 12 del tubito de alimentación 5 está dispuesto en una tobera que está limitada en el eje longitudinal del tubito de alimentación 5 hacia la sección IV entre la boca 12 del tubito de alimentación 5 y su abertura de salida 7. La sección IV se estrecha desde la boca 12 hacia la abertura de salida 7. Las segundas aberturas de entrada 4 para líquido de corriente envolvente están dispuestas en el plano de la boca 12 del tubito de alimentación 5. La sección transversal interna 5A del tubito de alimentación 5 termina en la boca 12.

Ejemplo 1: detección de espermatozoides que contienen cromosomas Y en semen fresco y clasificación específica de sexo

El semen de toro obtenido de manera fresca se diluyó en un diluyente de manera convencional y se incubó con colorante específico de ADN, por ejemplo bisbencimida H 33342 (Hoechst) durante 30 a 60 min a una temperatura de 20 °C a 40 °C, y a continuación se radió en un citómetro de flujo, de acuerdo con el documento US 5125759 o el documento DE 2005 044 530 con luz de la longitud de onda de excitación para el colorante. Se midió la emisión respectiva.

La alineación de los espermatozoides se determinó con un detector que estaba orientado directamente aguas abajo de la abertura de salida hacia la corriente de líquido saliente de gotitas aisladas. Todo el contenido de ADN se determinó con un detector adicional que estaba orientado adicionalmente aguas abajo hacia la corriente de líquido. El dispositivo de desviación presentaba dos placas cargadas de manera opuesta a ambos lados de la corriente de líquido y un contacto para la carga eléctrica del líquido en la tobera. Esta carga se cargó como se conoce, en función de la señal del detector que determina la alineación de los espermatozoides, y la polaridad de la carga en función de la señal del detector para determinar el contenido total de ADN. De esta manera, los espermatozoides se desviaron

en función de la señal detectada a través de un campo eléctrico en fracciones específicas del cromosoma sexual.

Opcionalmente se añadió un fluoruro para la inmovilización de los espermatozoides, por ejemplo al líquido de transporte o envoltante empleado durante el procedimiento de clasificación, y/o antes o durante la adición del colorante para aumentar la penetración del colorante en los espermatozoides. Los fluoruros se añadieron en el intervalo de 0,1 a 100 mM, preferentemente de 10 nM a 10 mM. Se encontró que la concentración óptima para la especie es específica y pudo determinarse en general como la concentración que en la observación microscópica dio como resultado una inmovilización de al menos 90 % de los espermatozoides, preferentemente de sustancialmente todos los espermatozoides. De manera correspondiente, la presente invención se refiere también a las composiciones de las fracciones de espermatozoide producidas con el procedimiento de acuerdo con la invención, y a un procedimiento para la fabricación de fracciones de espermatozoides específicas del sexo y conservación siguiente de las fracciones de espermatozoide de mamíferos no humanos, en cada caso preferentemente en presencia de fluoruro y/o medios antioxidantes.

Lista de números de referencia

- | | | | |
|----|--|----|---|
| 1 | primera abertura de entrada | 8 | unión de acero noble para la transmisión de carga |
| 2 | elemento de sujeción | 9 | suministro de líquido |
| 3 | cristal piezoeléctrico | 10 | primer extremo de la tobera |
| 4 | segunda abertura de entrada | 11 | segundo extremo de la tobera |
| 5 | tubito de alimentación | 12 | boca |
| 5A | sección transversal interna del tubito de alimentación | 13 | soporte |
| 5B | sección transversal externa del tubito de alimentación | 14 | bloque |
| 6 | inserto de tobera | 15 | bloque |
| 7 | abertura de salida | 16 | tapa |
| | | 17 | pared |
| | | 18 | pared |
| | | 19 | obturación |
| | | 20 | saliente |

REIVINDICACIONES

1. Tobera para la alineación de partículas para un citómetro de flujo con un primer extremo (10) y un segundo extremo (11) enfrentado y un tubito de alimentación (5) para líquido de corriente de núcleo, con su boca (12) dispuesta en el volumen interior de la tobera, que está dispuesto en una sección adyacente a su boca (12) en un eje común con la tobera, presentando el tubito de alimentación (5) una primera abertura de entrada (1) para líquido de corriente de núcleo y su boca (12) está distanciada con respecto a una abertura de salida (7) dispuesta en el segundo extremo (11) de la tobera, y la tobera presenta una segunda abertura de entrada (4) para líquido de corriente envolvente, extendiéndose la sección adyacente a la boca del tubito de alimentación (5) por la longitud completa del tubito de alimentación (5) que está dispuesta dentro de la tobera, y siendo la sección transversal interna (5A) del tubito de alimentación (5) para líquido de corriente de núcleo perpendicular al eje longitudinal del tubito de alimentación (5), **caracterizada por que** la sección transversal interna (5A) del tubito de alimentación (5) al menos en la sección adyacente a su boca (12), en una primera dimensión, es más pequeña al menos en el factor 0,3 que en una segunda dimensión, y por que la sección transversal interna del tubito de alimentación (5) es rectangular o elíptica, y en la primera dimensión asciende de 50 µm a 200 µm, y en la segunda dimensión de 75 µm a 300 µm.
2. Tobera de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** el tubito de alimentación (5) presenta una sección transversal interna (5A) rectangular cuya extensión longitudinal está situada en la segunda dimensión.
3. Tobera de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** el tubito de alimentación (5) presenta una sección transversal interna (5A) ovalada cuya extensión longitudinal está situada en la segunda dimensión.
4. Tobera de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** el volumen interno de la tobera está limitado a lo largo de su eje longitudinal en la sección entre la abertura de salida (7) de la tobera y la boca (12) del tubito de alimentación (5).
5. Tobera de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** un cristal piezoléctrico (3) está dispuesto a una distancia con respecto al primer extremo (10) de la tobera en una pared que cierra la sección transversal de la tobera excepto el tubito de alimentación (5).
6. Tobera de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la tobera presenta una conexión eléctrica que contacta el volumen interno de la tobera.
7. Tobera de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** el tubito de alimentación (5) presenta dentro de la tobera un espesor de pared constante.
8. Tobera de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la sección transversal interna del tubito de alimentación (5) disminuye desde el primer extremo (10) de la tobera hasta su boca (12).
9. Tobera de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** el tubito de alimentación (5) se forma mediante un soporte (13), una tapa (16) distanciada del soporte (13) y dos bloques (14, 15) distanciados uno de otro dispuestos entre soporte (13) y tapa (16).
10. Tobera de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** el volumen interno de la tobera está limitado por un soporte (13) y una tapa (16) distanciada de este y paredes (17, 18) que se extienden distanciadas del tubito de alimentación entre soporte (13) y tapa (16).
11. Tobera de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada por que** las paredes (17, 18) están dispuestas a lo largo del eje longitudinal del tubito de alimentación (5) en paralelo a las superficies de los bloques (14, 15) que están dirigidas a las paredes (17, 18).
12. Tobera de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizada por que** las superficies dirigidas unas hacia otras de soporte (13) y tapa (16) son paralelas y planas.
13. Tobera de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 12, **caracterizada por que** las paredes (17, 18) discurren unas hacia otras en una sección de la tobera que se extiende entre la boca (12) del tubito de alimentación (5) y la abertura de salida (7), y forman entre sí la abertura de salida (7).
14. Tobera de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizada por que** la tobera se estrecha en una sección (III) hacia la abertura de salida (7) dispuesta en el segundo extremo (11) de la tobera y está formada por un inserto de tobera (6) dispuesto de manera estanca al líquido.
15. Procedimiento para la alineación de partículas en un líquido de corriente de núcleo que contiene partículas revestido por líquido de corriente envolvente con las etapas: facilitar un líquido de corriente de núcleo y un líquido de corriente envolvente, bombear el líquido de corriente de núcleo a través de una primera abertura de entrada (1) a un tubito de alimentación (5), y bombear el líquido envolvente a través de una segunda abertura de entrada (4) y dejar

5 salir un líquido de corriente de núcleo revestido por líquido de corriente envolvente en el segundo extremo (11) de una tobera enfrentado al primer extremo (10) de la tobera a través de una abertura de salida (7), conduciéndose el líquido de corriente de núcleo en el tubito de alimentación (5), que está dispuesto en una sección adyacente a su boca (12) sobre un eje común con la tobera, y siendo la sección transversal interna (5A) del tubito de alimentación (5) perpendicular al eje longitudinal del tubito de alimentación (5), extendiéndose la sección adyacente a la boca del tubito de alimentación (5) por la longitud completa del tubito de alimentación (5) que está dispuesto dentro de la tobera, **caracterizado por que** la sección transversal interna (5A) del tubito de alimentación (5) al menos en la sección adyacente a su boca (12), en una primera dimensión, es más pequeña al menos en el factor 0,3 que en una segunda dimensión, y por que la sección transversal interna del tubito de alimentación (5) es rectangular o elíptica y en la primera dimensión asciende de 50 μm a 200 μm , y en la segunda dimensión de 75 μm a 300 μm .

10 16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado por que** las partículas presentan en perpendicular a su eje longitudinal una sección transversal que es más pequeña en una primera dimensión que en una segunda dimensión.

15 17. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 15 a 16 para la fabricación de un preparado de partículas que presentan una sección transversal en perpendicular a su eje longitudinal, que es más pequeña en una primera dimensión que en una segunda dimensión, **caracterizado por que** las partículas son espermatozoides de mamíferos no humanos, con la etapa de detectar una propiedad de las partículas y la etapa del tratamiento de las partículas en función de la propiedad detectada y/o la etapa de la desviación de las partículas en función de la propiedad detectada en contenedores separados para la generación de al menos dos fracciones diferentes.

Fig. 1

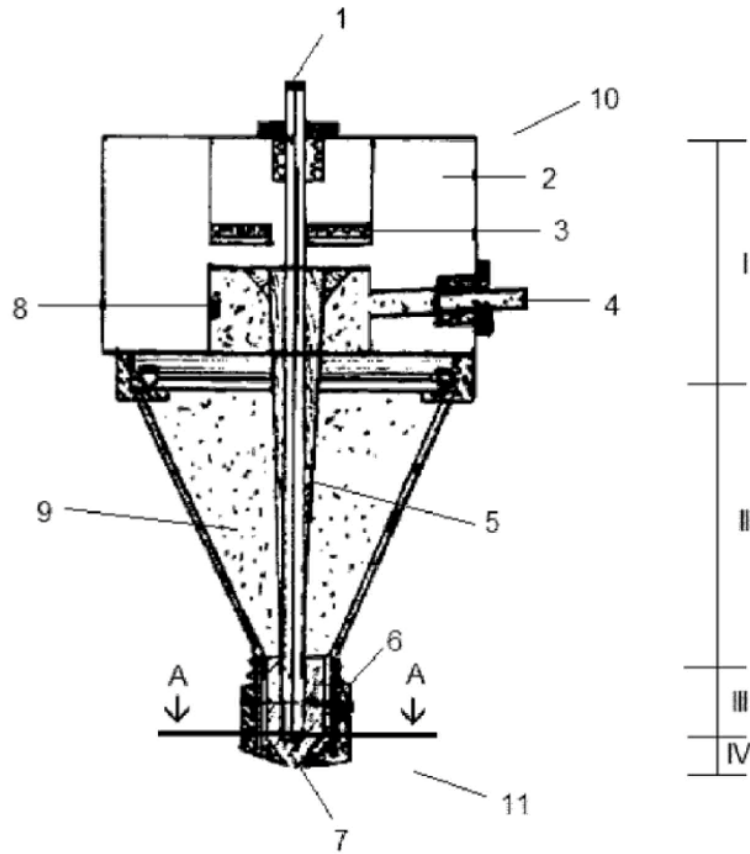


Fig. 2

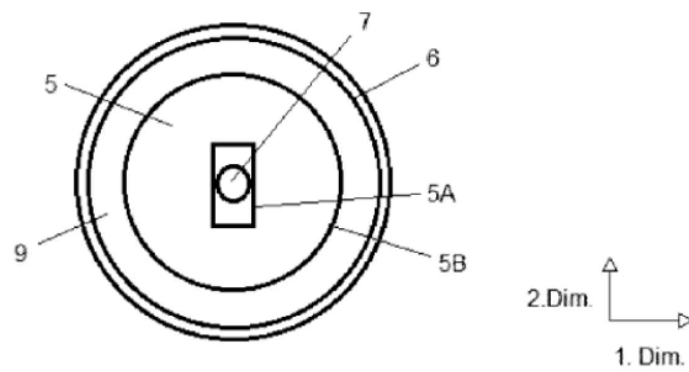


Fig. 3

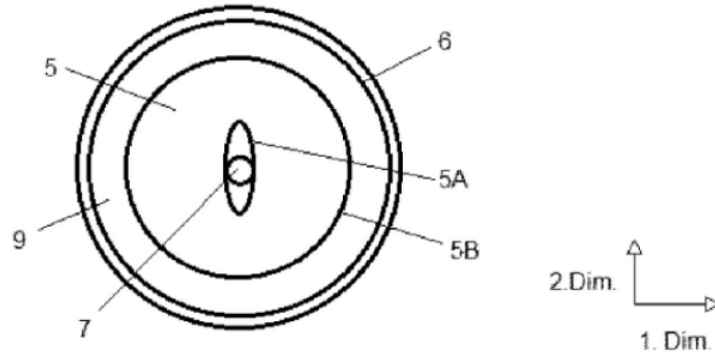


Fig. 4

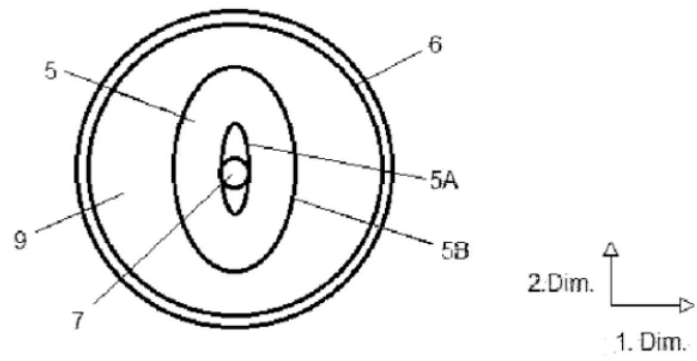


Fig. 5

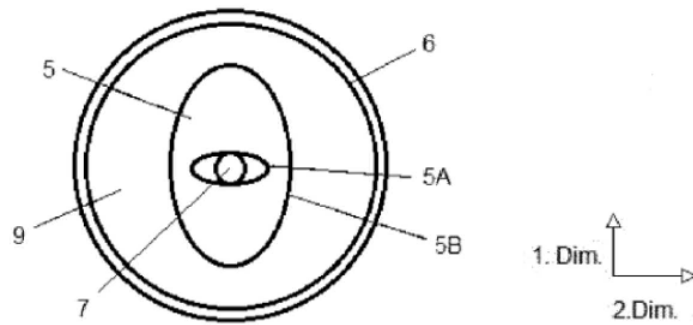


Fig. 6

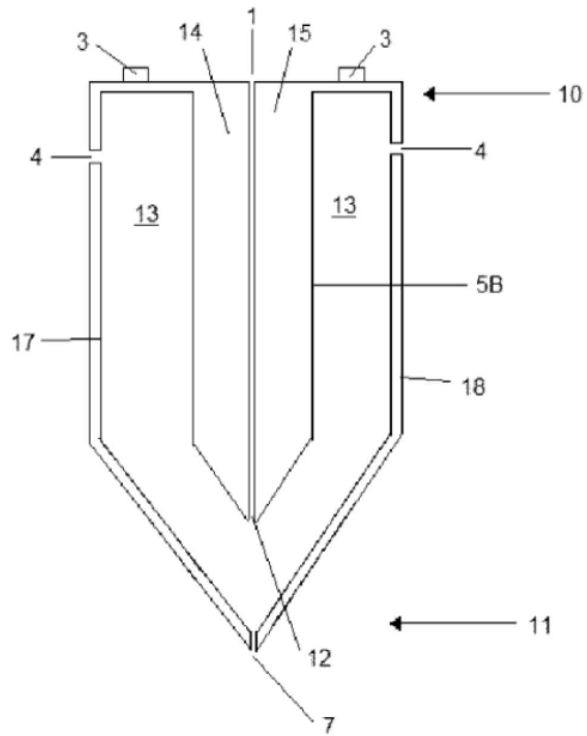


Fig. 7

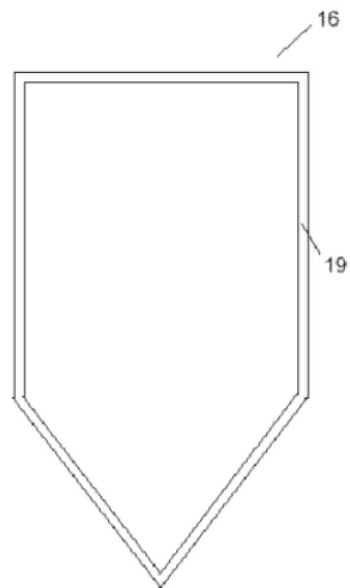


Fig. 8

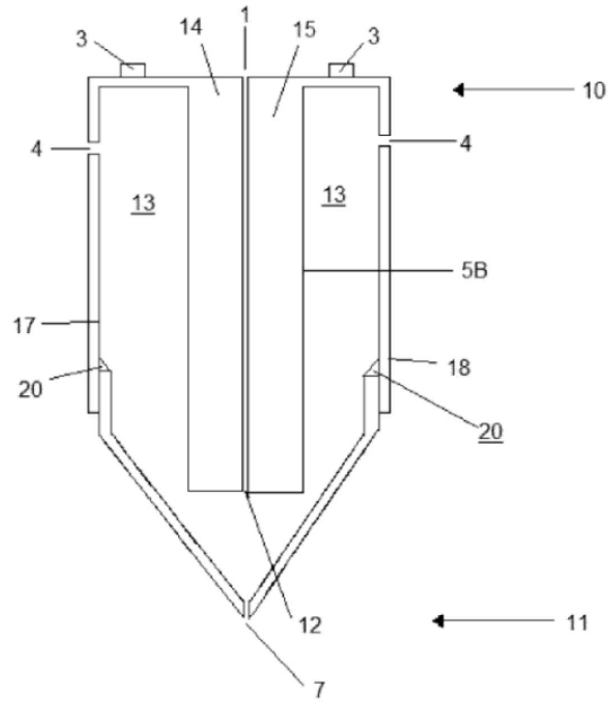


Fig. 9

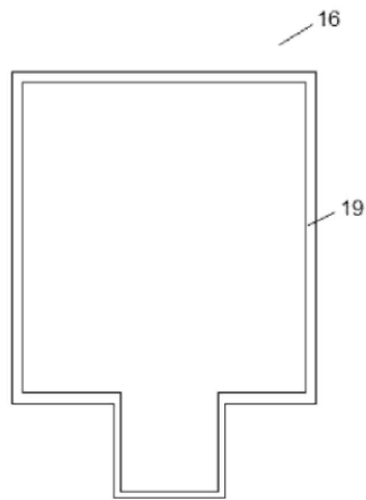


Fig. 10

