

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 306**

51 Int. Cl.:

G01N 21/01 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2006 E 09176836 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2166340**

54 Título: **Método y aparato para clasificar células**

30 Prioridad:

01.02.2005 US 46896

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

26.10.2017

73 Titular/es:

**PREMIUM GENETICS (UK) LIMITED (100.0%)
Alpha Building, London Road
Stapeley, Nantwich, Cheshire CW5 7JW, GB**

72 Inventor/es:

**MUETH, DANIEL;
ANDERSON, AMY L.;
KNUTSON, CHRISTOPHER R. y
PLEWA, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 639 306 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

Método y aparato para clasificar células

5 La invención se refiere a un clasificador de flujos que emplea un sistema de detección y de captura de imágenes selectivo multiangular para clasificar células. Otro aspecto de la invención se refiere a un método y a un aparato para la detección óptica y para la captura de imágenes de objetos.

10 Los sistemas de captura de imágenes conocidos tienden a ser acimutalmente simétricos, aceptando la luz dentro de un cierto intervalo de ángulos establecido por la apertura numérica (NA, por sus siglas en inglés, *Numerical Aperture*) del sistema de captura de imágenes. Toda la luz que viene del plano del objeto dentro de la NA se transfiere idealmente al plano de la imagen de manera uniforme, en ausencia de aberraciones o difuminación mediante la óptica o las aperturas que son demasiado pequeñas. La razón de este diseño es que es deseable tener una eficacia de captura de luz razonablemente alta (es decir, una NA alta) y que las variaciones angulares en intensidad a menudo no llevan información importante.

20 Un sistema de captura de imágenes de ejemplo es una única lente redonda o un par de lentes redondas. Para los casos en los que se desea una alta eficiencia de captura, tal como en los sistemas de captura de imágenes que son tenues, se diseña un sistema de NA alta usando un elemento óptico que es grande en comparación con el tamaño del objeto y que está cerca en comparación con su tamaño. De esta manera, la lente captura una gran fracción de la luz. Una NA alta también es importante para maximizar la resolución y para obtener una profundidad focal estrecha.

25 Los citómetros de flujo son dispositivos que utilizan la dispersión óptica y la fluorescencia para diferenciar entre células u otros objetos pequeños, tales como perlas fluorescentes, y para clasificarlos en base a las mediciones ópticas diferenciadas. A medida que los objetos fluyen a través de un chorro estrecho, la luz láser de entrada se dispersa, incidiendo en los objetos, e incita a la fluorescencia. Se detectan señales de luz dispersada y fluorescente en ángulos variables para caracterizar y diferenciar objetos con propiedades diferentes.

30 Una de las dificultades de la clasificación en el género de los espermatozoides es la forma muy plana de los espermatozoides, especialmente del esperma bovino. La forma plana, combinada con el mayor índice de refracción del ADN en relación con el entorno acuoso, provocan el efecto de lente de la luz y la reflexión interna, incluyendo la luz fluorescente que se origina en la cabeza del espermatozoide. Este efecto de lente provoca que la luz se emita preferentemente a través de los bordes de los espermatozoides, con una emisión mucho menor a través de las dos caras planas de la cabeza del espermatozoide. Por lo tanto, la detección de la intensidad de luz y la determinación del contenido cromosómico X o Y de los espermatozoides depende de la alineación fiable de los espermatozoides y de la capacidad de ver la fluorescencia de los espermatozoides desde múltiples ángulos.

40 Los sistemas de alineación conocidos emplean un dispositivo en el que los espermatozoides se orientan y se proyectan en una zona de detección por medio de una boquilla, tal como se ilustra en la patente de Estados Unidos n.º 5.985.216, de Rens et al. En tal dispositivo, la boquilla de clasificación tiene una sección transversal elíptica para orientar las células aplanadas. Una desventaja de Rens es que si el caudal es superior a aproximadamente 5.000 espermatozoides por segundo, las células no pueden captarse ni caracterizarse de forma fiable. Un caudal de 5.000 espermatozoides por segundo es ineficaz y lento. Un caudal más práctico para clasificar el esperma es de aproximadamente 100.000 espermatozoides por segundo o superior. El documento US 4.737.648 muestra también un ejemplo de detector de la técnica anterior.

50 En la solicitud de patente de Estados Unidos con n.º de serie 10/974.976, titulada "SYSTEM AND METHOD FOR MANIPULATING AND PROCESSING NANOMATERIALS USING HOLOGRAPHIC OPTICAL TRAPPING", presentada el 28 de octubre de 2004, y en la solicitud de patente de Estados Unidos con n.º de serie 10/934.597, presentada el 3 de septiembre de 2004, titulada "MULTIPLE LAMINAR FLOW-BASED PARTICLE AND CELLULAR SEPARATION WITH LASER STEERING" se describe un tipo de sistema de captura de imágenes utilizado para manipular pequeñas partículas.

Sumario de la invención

55 Según un primer aspecto, la invención proporciona un aparato detector para la formación de imágenes de un objeto (660) en una célula de flujo de un clasificador de flujos, comprendiendo dicho aparato:

60 una fuente óptica (342) que produce un haz de salida (344, 644) dirigido hacia una trayectoria de flujo (336) de la muestra en el clasificador de flujos para iluminar el objeto;

una lente colectora (664) proporciona una distancia predeterminada desde el plano del objeto (662) igual a una longitud focal eficaz de la lente colectora.

65 La iluminación del objeto (660) produce haces (646L, 646C, 646R) que salen de la lente colectora (664) y son colimados en forma de haces muy pequeños (666L, 666C, 666R) que se dividen en haces muy pequeños fuera del

eje y haces muy pequeños del eje central, para formar múltiples imágenes del objeto en la forma de luz que sale del plano del objeto a diferentes ángulos con relación a un eje central (C) del detector; caracterizado por:

5 una pluralidad de espejos de divisores de haces (672L, 672R) que separan los haces muy pequeños que salen de dicha lente colectora (664) en forma de dichos haces muy pequeños fuera del eje (666L, 666C, 666R) a lo largo del mismo eje, en cualquier lado de los haces muy pequeños del eje central (666C); en el que se determina una ubicación lateral de cada haz muy pequeño colimado (666L, 666C, 666R) principalmente mediante su ángulo desde el plano del objeto; y

10 una pluralidad de detectores (680L, 680C, 680R) sensibles a la luz de cada uno de dichos haces muy pequeños fuera del eje (666L, 666R) y dichos haces muy pequeños del eje central (666C).

Según un segundo aspecto, la invención proporciona un método de formación de imágenes de un objeto en una célula de flujo de un clasificador de flujos, que comprende:

15 producir un haz de salida dirigido hacia una trayectoria de flujo de la muestra en un clasificador de flujos, iluminando dicho haz de salida el objeto en la trayectoria de flujo de la muestra de la célula de flujo;

20 en el que la iluminación del objeto produce haces que salen de una lente colectora proporcionó una distancia predeterminada desde el plano del objeto igual a una longitud focal eficaz de la lente colectora;

25 colimar dichos haces que salen de dicha lente colectora en forma de haces muy pequeños que se dividen en forma de haces muy pequeños fuera del eje y haces muy pequeños del eje central, para formar múltiples imágenes del objeto en la forma de luz que sale del plano del objeto a diferentes ángulos con relación a un eje central de dicho clasificador de flujos;

30 separar dichos haces muy pequeños que salen de dicha lente colectora usando una pluralidad de espejos o divisores de haces, en forma de dichos haces muy pequeños fuera del eje a lo largo del mismo eje, y en cualquier lado de los haces muy pequeños del eje central; y

35 detectar el objeto usando un detector sensible a la luz de cada uno de dichos haces muy pequeños fuera del eje (666L, 666R) y dichos haces muy pequeños del eje central (666C);

en el que se determina una ubicación lateral de cada uno de los haces muy pequeños colimados principalmente mediante su ángulo desde el plano del objeto.

40 La presente invención se basa en el descubrimiento de que un clasificador de flujos para clasificar y orientar células emplea un canal de flujo que tiene una entrada, una salida, una zona de detección intermedia, y opcionalmente, una zona de clasificación. La entrada recibe una de cada una de las corrientes alternas separadas del fluido envolvente de entrada y una corriente de muestra que contiene las células a clasificar entre las corrientes envolventes. Las corrientes envolventes y la corriente de muestra tienen caudales o presiones en la cámara de flujo respectivos, de tal manera que la corriente de muestra se estrangula formando de este modo una corriente de muestra relativamente estrecha en la zona de detección mediante la que las células se orientan en una dirección seleccionada con respecto a la luz de entrada. Un detector que emplea una configuración multiángulo o una configuración de imágenes de vector K se enfoca en la zona de detección para discriminar entre las células deseadas y las no deseadas.

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1 es un diagrama de flujo de las etapas para clasificar células que se han teñido con un tinte fluorescente.

La figura 2 es una ilustración esquemática en perspectiva de un dispositivo o cartucho de flujo de acuerdo con la invención.

55 La figura 3 es una ilustración esquemática de un dispositivo de flujo de canal único para clasificar, que no forma parte de la presente invención.

La figura 4 es una vista lateral de un dispositivo de flujo multicanal para clasificar.

60 La figura 4A es una vista en planta (borde) superior, orientada a las entradas del sistema multicanal mostrado en la figura 4.

La figura 5 es una representación esquemática de un detector de canal único para detectar la luz dispersada (es decir, el sistema óptico para captar imágenes de vector K).

65 Las figuras 5A-5D ilustran elementos ópticos alternativos empleados en la disposición de la figura 5.

La figura 6 es una representación esquemática de un detector de canal único para detectar luz fluorescente y luz dispersada utilizando captura de imágenes de vector K.

5 La figura 7 es un dispositivo de canal multicanal para capturar imágenes de vector K con excitación y detección de luz dispersada y fluorescente.

La figura 8 es una representación esquemática de un accionador externo que ajusta las velocidades de flujo en un canal o en un dispositivo para clasificar células.

10 La figura 9 es una representación esquemática de una vista superior de un dispositivo multicanal o cartucho para detectar y clasificar células.

15 Las figuras 10A-10D muestran varias formas alternativas de dirigir células que utilizan tres accionadores en M,W, F (figura 10 A), dos accionadores en S1, S2 (figura 10B), un accionador en S1 (figura 10C), y dos accionadores en M, F (figura 10D).

20 Las figuras 11A-11B muestran varias formas alternativas de destruir células mediante destrucción o activación por láser (figura 11A), y destrucción o activación eléctrica (figura 11B).

Descripción de la invención

25 La figura 1 ilustra un diagrama de flujo que expone las etapas para caracterizar, clasificar y procesar objetos, para la conservación criogénica, particularmente de los espermatozoides bovinos.

La primera fase desde la recogida 100, la extensión 101, hasta el enfriamiento lento 102, es el objeto de diversos procedimientos, algunos de los cuales son novedosos y otros ya se conocen.

30 Un sistema novedoso para preparar células para la clasificación se expone en la solicitud de patente de Estados Unidos con n.º de serie (por asignar) en trámite junto con la presente, titulada: "Novel Method For In Vivo Staining of Cells for Identification and Sorting", presentada el 1 de febrero de 2005.

35 Las etapas incluyen cargar una muestra en un chip desechable 200; filtrar la muestra para eliminar el material agregado de gran tamaño 201, tal como agregados vitelinos; emplear una alineación basada en el flujo 202 como se expone en lo sucesivo en el presente documento; emplear la detección de género paralelizada 203, las etapas de discriminación (es decir, la discriminación de género 204) y el accionamiento (es decir, el accionamiento de género 205); la concentración pasiva y la compensación 206, y el suministro a un depósito de salida 207. El método también puede suprimir opcionalmente algunas etapas e incluir una etapa de discriminación y de destrucción para eliminar espermatozoides vivos no deseados.

40 Las etapas de clasificación de género 103 que incluyen todo lo anterior, vas seguidas de las etapas de enfriamiento lento a 4 °C y sedimentación 104; extensión final 105; envasado en pajuelas 106; sedimentación 107 y congelación 108.

45 Las figuras 2-3 ilustran en diversas formas un citómetro de flujo 300 de acuerdo con la invención. El dispositivo puede ser un sistema de canal único. Sin embargo, la invención está bien adecuada para aplicaciones multicanal, particularmente en aplicaciones de clasificación de espermatozoides, donde debe clasificarse un gran número de espermatozoides en una cantidad razonable de tiempo.

50 En las figuras 2-3, el dispositivo 300 comprende una cámara de cuerpo o cámara de flujo 312 formada por un par de paredes enfrentadas 314 y de paredes terminales 316 (solo una de las cuales se muestra en la figura 1), una parte superior abierta o entrada 318 y un fondo abierto o salida 320.

55 La entrada 318 se divide en tres secciones que incluyen entradas exteriores 322 y una entrada central o entrada de la muestra 324. Las entradas exteriores 322 son para recibir un fluido envolvente 326 en las mismas y la entrada central 324 es para recibir un fluido de muestra 328 que contiene un medio líquido y células 330 dispersadas en el mismo.

60 La salida 320 tiene secciones exteriores de salida 332 y canales centrales de recogida de muestra, específicamente, un canal izquierdo de salida de la muestra 334L, un canal central de salida de la muestra 334C y un canal derecho de salida de la muestra 334R. El canal 334L es para una primera muestra clasificada, el canal 334C es para una segunda muestra clasificada y el canal 334R es para otra muestra clasificada.

65 El fluido envolvente 326 se introduce en las entradas exteriores 322 con un caudal seleccionado. El fluido de muestra 326 se introduce en la entrada central 324 con un caudal o presión seleccionados en relación con el caudal o la presión del fluido envolvente, de tal manera que los fluidos envolventes comprimen y estrangulan el flujo de la

muestra a una trayectoria de flujo de la muestra relativamente estrecha 336 como se muestra. En una realización ejemplar, la anchura de la trayectoria de flujo de la muestra 336 es aproximadamente un 10 % o menos de la anchura del fluido de muestra en la entrada central de 324, por ejemplo, aproximadamente 50 micrómetros.

5 Las células 330 son circulares pero aplanadas. Como resultado, el estrangulamiento del fluido de muestra hace que las células 330 se orienten de modo que sus lados planos sean más o menos paralelos a las paredes enfrentadas 314. La intensidad de la luz irradiada por una célula es diferente en diferentes orientaciones. Por eso, para
10 comparar la intensidad de dos o más células, estas deben tener la misma orientación. Por lo tanto, las células alineadas reducen el ruido o el error sistemático causado por tener emisores de luz anisotrópica en orientaciones aleatorias.

Al alternar las entradas de fluido envolvente 326 y la entrada de la muestra o de la solución objeto 328 (véase la figura 3) que entran en el sistema, se crea una pequeña cantidad de estrangulamiento (en relación con el
15 estrangulamiento en la dirección ortogonal) 401, que provoca la cizalladura, y el flujo de cizallamiento alinea las células 400. Este patrón de flujo alterno se comprime más severamente entre dos flujos de entrada de fluido envolvente largos, lo que consigue la alineación necesaria. Esta disposición puede combinarse, en lo sucesivo en el presente documento, con la detección, para proporcionar un sistema paralelo en el que puedan interrogarse múltiples flujos.

20 Específicamente, el flujo de estrangulamiento mueve objetos en el plano focal 402, y acelera el movimiento a través de la zona de detección 403. La curva 404 en el sistema muestra el límite de fluido 404, y la zona de detección 405 permite la caracterización. El cono de luz 406 permite la interrogación, y la posición de la corriente de defecto 407 puede dirigirse entre múltiples salidas.

25 Al variar el caudal a través de los tres canales de salida 409-411, las células u otros objetos en la solución pueden clasificarse en una de las múltiples corrientes de salida. El accionamiento puede hacerse de varias maneras, como se ha especificado anteriormente. La conmutación de flujo de alta velocidad puede realizarse mediante dispositivos piezoeléctricos que pueden ser intrínsecos a la máquina o intrínsecos al cartucho de canal de flujo desechable. La
30 región de conmutación de flujo 408 controla el caudal preciso, que varía con el tiempo para cambiar entre los canales de salida 409-411 (donde $V2 < V1$ y $V4 \sim v2$).

El detector 340 (figura 2) comprende un láser 342 u otra fuente adecuada que produzca un haz de salida 344 dirigido hacia la trayectoria de flujo de la muestra 336 en una zona de detección 338 intermedia entre la entrada y la
35 salida. El haz 344 incide sobre la célula 330 en la zona de detección 338 y se dispersa formando un haz de salida 346. La célula contiene un fluoróforo y, por lo tanto, también produce luz fluorescente, que está contenida en el haz de salida 346. Los componentes dispersados y fluorescentes respectivos 346S, 346F del haz de salida 346 se introducen en un detector óptico que contiene un sistema óptico 348 y un sistema detector electrónico 350. El sistema óptico y el sistema detector electrónico se analizan en lo sucesivo en el presente documento.

40 El haz de salida 346 lleva la información al detector 340 que discrimina entre las células 330 y produce una salida 354 a un clasificador 356. El clasificador 356 controla los controladores 358 en relación operativa con los canales de salida 334 para variar los caudales relativos, de manera que cada célula 330 se clasifique en un canal apropiado. Alternativamente, las células pueden clasificarse como deseadas o no deseadas, y las células deseadas pueden
45 recogerse y las células no deseadas pueden destruirse.

La figura 3 muestra un sistema de canal único que tiene solo dos flujos envolventes 326 y un único flujo de muestra 328. La figura 4 muestra un sistema multicanal con cuatro flujos de muestra 328 y flujos envolventes compartidos 326. La figura 4A muestra la cámara de flujo y las trayectorias de flujo en planta superior.

50 Las figuras 4-4A muestran una posible forma de paralelizar el diseño para tener muchas corrientes paralelas 500 de la solución de entrada. El flujo puede estrangularse tanto en el plano como normal al plano. Sin embargo, para los casos en los que es necesaria la alineación de las células, tal como con el esperma bovino, el cizallamiento a lo largo de la dirección de la luz entrante debe ser mucho mayor para garantizar la alineación normal a la luz entrante. La región de investigación óptica 502 es donde tiene lugar la dispersión láser y la fluorescencia.

55 En el ejemplo, cada envolvente tiene un sistema de lentes especializado, múltiples elementos PMT cada uno de los cuales se dedica a una corriente correspondiente. Debe entenderse que el sistema puede tener un sistema detector de la lente para todos los canales y también un sistema óptico de láser para todos los canales. Hay múltiples posibles canales de salida 503 para cada corriente de flujo.

60 En la figura 5 se muestra una vista en planta simplificada del sistema óptico del detector 640. Una muestra 660 se encuentra en un plano del objeto 662. En esta ilustración, el haz de salida o los rayos de luz 646 emanan de la muestra 660 como haces elementales 646C, 646L, 646R. Los haces elementales 646C representan haces agrupados en el centro cerca del eje óptico central C; y los haces elementales 646L y 646R se agrupan a la
65 izquierda y a la derecha del eje central C. Los haces elementales proporcionan diferentes vistas de la muestra 660. Una lente colectora 664 (que puede ser una lente objetivo de un microscopio) se coloca a una distancia del plano del

objeto 662, que es igual a la longitud focal efectiva (EFL, por sus siglas en inglés, *Effective Focal Length*) de la lente. La lente 664 puede ser una lente compuesta, si se desea, pero por simplicidad se describe como una única lente con una EFL. Por lo tanto, al colocar la lente 664, la luz 646 del objeto que sale de la lente colectora 664 se colima como haces elementales 666 divididos a su vez, como 666R, 666C, 666L como se muestra. Esto crea un espacio
 5 infinito en el sistema de captura de imágenes. Aunque la presente invención no requiere este espacio infinito, es una disposición conveniente. El posicionamiento lateral de cada rayo de luz colimado se determina principalmente por su ángulo que viene del plano del objeto. Los haces elementales 666L, 666R y 666C siguen a los haces elementales respectivos 642L, 642R y 642C.

10 Los haces elementales de luz central 666C salen de la lente 664 a lo largo de eje central C para centrarse en la lente 676C que enfoca la luz en el siguiente plano de la imagen 678C. Los espejos 672L, 672R separan los haces elementales 666L y 666R fuera del eje que salen de la lente colectora 664. Téngase en cuenta que esto también puede hacerse con la colocación del detector 674A (figura 5A) o de fibra óptica 674B (figura 5B) en esta región, que son pequeños en comparación con el tamaño del haz en este espacio. Téngase en cuenta también, que en este
 15 espacio pueden insertarse elementos ópticos adicionales, tales como lentes adicionales 674C (figura 5C) o un orificio 674D (figura 5D) para restringir el intervalo de ángulos de luz que salen de la lente colectora 664, o para controlar (reiniciar o expandir) la profundidad focal desde la que se recoge la luz como en las mediciones de microscopía confocal. En algunas circunstancias, pueden utilizarse un par de lentes adicionales, con un orificio. En otros casos, puede utilizarse una máscara con tamaño, forma o posición controlables, para controlar la luz que llega
 20 a un detector dado.

La luz de los haces elementales 666L se desvía mediante el espejo 672L a la lente de enfoque izquierda 676L; y la luz del haz elemental 666R se dirige mediante el espejo 672R a la lente 676R y al plano derecho de la imagen 678R. Los detectores de luz 680L, 680R y 680C pueden estar situados en los respectivos planos focales de la
 25 imagen 678L, 678R y 670C para detectar las imágenes respectivas. Estos detectores de luz pueden ser CCD, fotodiodos, tubos fotomultiplicadores, tubos fotomultiplicadores multi-ánodo u otros detectores.

En muchos casos, es deseable recoger tanto la luz dispersada como la luz fluorescente, en las que al menos una de las imágenes o detecciones realizadas requieren un intervalo reducido de ángulos de rayos de la muestra. La figura
 30 6 ilustra cómo puede hacerse esto, utilizando la configuración de imágenes de vector K como se ha descrito anteriormente, pero con filtros y divisores de haces adicionales según sea necesario. Los elementos similares tienen los mismos números de referencia.

En la figura 6, la iluminación y la luz de excitación 800 pasa a través de la lente colectora 801, y se refleja mediante los espejos 802, 803 a través de filtros de emisión 688EL, 688ER a las lentes de enfoque 804, 805 y a los
 35 fotodetectores 690L, 690R, respectivamente, que forman los planos izquierdo y derecho de la imagen fluorescente.

El divisor de haz en 686C redirige la luz en el campo central 666C a través de un filtro de emisión 688E a la lente de enfoque 676FC. La salida 689E del filtro de emisión 688E corresponde a la emisión de fluorescencia de la célula. El
 40 filtro de la línea láser 688L en el eje óptico central filtra la luz láser dispersa a la lente 676C y al fotodetector 690C, en los que se forma el siguiente plano de la imagen dispersada.

Se desea la paralelización para mejorar el rendimiento y las capacidades generales de un dispositivo. La figura 7 muestra cómo se logra esto. El láser 642 produce un haz de láser de entrada 644, que excita la fluorescencia, se divide en N haces múltiples mediante el divisor de haz 690 (por ejemplo, red de difracción u holograma). Los haces
 45 692A y 692N se dispersan y cada uno se dirige a la zona de detección de una envolvente de muestra correspondiente (véase figura 4). Los haces elementales 692A-692N se coliman en haces paralelos mediante la lente colimadora 694. La salida 696 de la lente colimadora 694, se dirige a través de la lente cilíndrica 698 que enfoca los haces individuales 700A-700N en las corrientes de muestra en el plano del objeto 701. Como se muestra, (figura 4) la corriente de entrada se divide en muchas corrientes. La luz procedente de uno o todos los haces
 50 elementales 700A-700N en el ejemplo mostrado y las corrientes de muestra entran en la lente colectora 702K y se trata como se ha descrito anteriormente en la figura 6. Aquí, sin embargo, se utiliza un dispositivo de conjunto de detectores (tal como los PMT multi-ánodo) 720 (720C, 720R, 720L, 720CF...) para cada grupo de haces de detección. La detección se logra mejor, no mediante la colocación de un único detector en cada posición de captura
 55 de imágenes, sino mediante el uso de un conjunto de detectores, tal como un conjunto PMT lineal de 32 elementos 720.

El rendimiento de un sistema que captura imágenes o hace mediciones en muchos objetos dependerá, en parte, del número de detectores y de su velocidad. Para muchas aplicaciones, en cada plano de imagen se utiliza un único
 60 detector, tal como un tubo fotomultiplicador (PMT). Esto es adecuado para los casos en los que los objetos pasan a través del plano del objeto en una línea de fila única. El clasificador 856 se describe en detalle en lo sucesivo en el presente documento. En la figura 8 se muestra un clasificador de canal único.

El clasificador 856 comprende un miembro estructural 812; un canal que define la capa 816 formada con una ranura 818 que define un canal de flujo 820; una capa de membrana flexible 822 encima del canal que define la capa 816, y
 65 un miembro estructural 824 que completa la disposición. Se acopla un accionador piezoeléctrico o de otro tipo 826 a

un controlador 828. Un pistón 860 impulsado mediante el accionador 826 se acopla a la membrana flexible 822 opuesto al canal de flujo 820 para cambiar el patrón de flujo dentro del canal de acuerdo con el suministro de tensión la alimentación de tensión al piezoeléctrico. Una pluralidad de tales estructuras puede miniaturizarse para localizarse en la ventana del accionador mediante la cual pueden clasificarse múltiples flujos de muestras.

5 El uno o más accionadores 826 pueden incluir: un transductor piezoeléctrico para convertir las señales eléctricas en el accionamiento mecánico de los caudales; un calentador térmico para calentar una región para expandir rápidamente un fluido, material o burbuja; una generación de burbujas térmica para crear una burbuja para reducir el flujo de la solución; un dispositivo de movimiento capacitivo para una membrana; un dispositivo óptico para calentar
10 o mover el material, pared, membrana, burbuja, u otro material u objeto para impactar la velocidad de flujo en uno o más de los canales de salida 934. El accionamiento puede ser intrínseco al dispositivo o puede aplicarse externamente. Por ejemplo, el accionador 826 y el pistón 860 pueden ser un equipo externo, separado del dispositivo de flujo desechable 856 (es decir, el chip desechable con accionador externo/no desechable).

15 La figura 9 ilustra la disposición en paralelo de múltiples canales en los que los canales de entrada 900 alimentan las corrientes envolventes a los canales de flujo y los canales de salida 901 reciben los diversos espermatozoides clasificados. Se proporciona la ventana 930 para acoplar la luz de interrogación a cada uno de los canales
20 demuestra de detectores paralelos. La ventana de clasificación 932 recibe una pluralidad de accionadores y elementos clasificadores desechables. Las clavijas de registro de chips del dispositivo 100 se designan como 940.

25 Las figuras 10A-10E ilustran realizaciones alternativas para dirigir células, que emplean una variedad de accionadores 934 en un dispositivo de flujo para clasificar esperma. En cada caso, se utilizan uno o más accionadores, en el que cada accionador podría basarse en dispositivos piezoeléctricos (intrínsecos o extrínsecos al cartucho), accionadores capacitivos, expansión térmica, u otras tecnologías como se ha descrito en las divulgaciones anteriores. En la mayoría de los casos, se desean al menos dos accionadores 934, y posiblemente más de dos accionadores, para controlar por qué canal de salida 936 entra una célula u objeto particular. Los accionadores permiten controlar y variar los flujos a tasas muy altas. Son necesarias solamente perturbaciones mínimas en el flujo para provocar que una corriente se mueva temporalmente de una salida a otra.

30 Las figuras 11A-11B muestran ejemplos de configuraciones de destrucción o de activación sin clasificación para lograr un resultado deseable. En la figura 11A, un láser 940 incide sobre la corriente del objeto/espermatozoide 942. Este láser se controla para que solamente incida energía letal en ciertos espermatozoides u objetos en función del resultado de la interrogación.

35 Por ejemplo, este láser puede destruir ciertos espermatozoides u otras células según se desee. Por ejemplo, puede destruir todos los espermatozoides de un género determinado o incierto. Alternativamente, el láser no puede destruir directamente las células, pero puede "activarlas" de otro modo. Por ejemplo, podría activar algún producto químico que se haya introducido previamente en los espermatozoides, dando como resultado general la destrucción de los mismos o afectando de otra manera a la fertilización. En las aplicaciones más generales, la activación puede tener
40 un intervalo mucho más amplio de actividades.

45 La figura 11B muestra la destrucción o activación utilizando pulsos eléctricos letales, introducidos a través de electrodos 944 que se insertan en el flujo para acceder localmente a la corriente central 942. Al igual que con la solución láser, los electrodos pueden activarse o desactivarse rápidamente dependiendo del resultado de la interrogación.

50 El direccionamiento también puede conseguirse ópticamente, en el que las células se manipulan mediante un aparato de captura óptica. Alternativamente, el proceso de accionamiento puede ser la electroporación de las células, que puede ser letal o tener otro efecto sobre las células.

La siguiente técnica alinea los espermatozoides utilizando el flujo de compresión:

55 Se introdujeron tres flujos en un chip de flujo usando una bomba peristáltica. Cada flujo se mantuvo en régimen laminar de manera que cada flujo no se mezcle con los otros. La corriente que contiene espermatozoides fluye entre las corrientes superiores e inferiores que son aguas. Aunque la velocidad del flujo superior e inferior se mantiene igual, al cambiar la relación de estas con el flujo de espermatozoides, se pudo ver la compresión del flujo de esperma.

	orientación de los espermatozoides (%)			
	ángulo desde la dirección de flujo (grados)			
Re	<3	<15	<45	>45
0,66	51,35	29,73	13,51	5,41
1,35	61,11	14,81	22,22	1,85

ES 2 639 306 T3

2,13	66,77	16,67	16,67	0
------	-------	-------	-------	---

Se espera que el flujo comprimido ayude a que los espermatozoides se orienten a la dirección del flujo.

5 Se tomaron imágenes de los espermatozoides en el flujo usando una cámara CCD equipada en nuestro microscopio.

10 La tabla anterior muestra el grado de orientación de los espermatozoides en el flujo, donde Re es el número de Reynolds definido como Du/μ donde D es el diámetro del canal de flujo, U es la velocidad, ρ es la densidad del fluido y μ es la viscosidad.

10 Re indica si el flujo es laminar o no. Incluso aunque valores de Re por debajo de 1000 se consideran flujo laminar, en algunas aplicaciones, se requieren valores muy pequeños de Re , tal como inferiores a 1.

15 A medida que aumenta la velocidad del flujo de espermatozoides, el valor de Re en el canal de entrada aumenta, pero todavía permanece en la región laminar que indica que la corriente de flujo no se perturba en nuestra región experimental.

20 La orientación de los espermatozoides se cuantificó mediante la numeración de los mismos en función del grado de alineación de la cabeza de los espermatozoides a la dirección del flujo.

20 En el intervalo del experimento, aproximadamente el 80% de los espermatozoides capturados estaban orientados en menos de 15 grados a la dirección del flujo.

25 Se mostró una mejor alineación a la dirección del flujo a mayor velocidad, pero también se encontraron más espermatozoides perturbados.

Los resultados muestran que el sistema podría alinear espermatozoides usando esta técnica.

30 Se debe entender que el control de la temperatura del fluido envolvente y del fluido de muestra puede emplearse para prolongar la vida de los espermatozoides. En una realización de ejemplo, la temperatura de los fluidos en el dispositivo de flujo puede mantenerse alrededor de 2 a 10 °C para inmovilizar los espermatozoides y, por lo tanto, prolongar su vida útil.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato detector para la formación de imágenes de un objeto (660) en una célula de flujo de un clasificador de flujos, comprendiendo dicho aparato:
- 5 una fuente óptica (342) que produce un haz de salida (344, 644) dirigido hacia una trayectoria de flujo de una muestra (336) en el clasificador de flujos para iluminar el objeto;
- 10 una lente colectora (664) proporciona una distancia predeterminada desde el plano del objeto (662) igual a una longitud focal eficaz de la lente colectora;
- 15 la iluminación del objeto (660) produce haces (646L, 646C, 646R) que salen de la lente colectora (664) y son colimados en forma de haces muy pequeños (666L, 666C, 666R) que se dividen en haces muy pequeños fuera del eje y haces muy pequeños del eje central, para formar múltiples imágenes del objeto en la forma de una luz que sale del plano del objeto a diferentes ángulos con relación a un eje central (C) del detector;
- caracterizado por:
- 20 una pluralidad de espejos de divisores de haces (672L, 672R) que separan los haces muy pequeños que salen de dicha lente colectora (664) en forma de dichos haces muy pequeños fuera del eje (666L, 666R) a lo largo del mismo eje, en cualquier lado de los haces muy pequeños del eje central (666C); en el que se determina una ubicación lateral de cada haz muy pequeño colimado (666L, 666C, 666R) principalmente mediante su ángulo desde el plano del objeto; y
- 25 una pluralidad de detectores (680L, 680C, 680R) sensibles a la luz de cada uno de dichos haces muy pequeños fuera del eje (666L, 666R) y dichos haces muy pequeños del eje central (666C).
- 30 2. El aparato de la reivindicación 1, en el que el detector es sensible a al menos una de una luz dirigida a lo largo del eje óptico del detector y una luz dirigida fuera del eje del detector.
3. El aparato de la reivindicación 2, en el que el detector fuera del eje comprende al menos dos fotodetectores lateralmente desplazados con respecto al eje central para detectar una luz fuera del eje correspondiente a diferentes posiciones en el plano del objeto.
- 35 4. El aparato de la reivindicación 3, que incluye adicionalmente un filtro para filtrar al menos una de luz fluorescente y dispersada de cada haz.
- 40 5. El aparato de la reivindicación 3, en el que el fotodetector comprende un tubo fotomultiplicador de elementos múltiples para detectar múltiples haces de luz.
6. El aparato de la reivindicación 1, en el que la fuente óptica comprende un láser.
- 45 7. El aparato de la reivindicación 6, que incluye adicionalmente una lente para colimar la luz de cada objeto en forma de haces separados.
8. El aparato de la reivindicación 7, que incluye adicionalmente una lente colectora para cada haz.
- 50 9. Un sistema que comprende un aparato detector según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye adicionalmente un destructor de células en dirección descendente del detector para destruir células no deseadas.
10. El sistema de la reivindicación 9, en el que el destructor de células comprende al menos uno de un láser y electrodo para dirigir una energía letal a las células no deseadas.
- 55 11. El sistema de la reivindicación 9, en el que el destructor de células comprende una fuente de luz para activar una diana letal en la célula.
- 60 12. Un sistema que comprende un aparato detector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que incluye adicionalmente una electroporación de células para tratar o destruir eficazmente células no deseadas.
13. El aparato de la reivindicación 1, en el que el clasificador de flujos puede funcionar a aproximadamente 2°C - 10°C para prolongar la vida de las células.
- 65 14. El aparato de la reivindicación 1, en el que el detector (680L, 680C, 680R) en la zona del detector detecta células.

15. El aparato de la reivindicación 14, en el que las células son espermatozoides.
16. El aparato de la reivindicación 15, en el que el detector detecta células deseadas y dichas células deseadas son una de células de cromosoma X o cromosoma Y.
- 5 17. El aparato de la reivindicación 16, en el que las células no deseadas son una de dichas células de cromosoma X o cromosoma Y.
- 10 18. El aparato de la reivindicación 17, en el que dichas células no deseadas son destruidas usando una emisión de láser.
19. Un sistema que comprende un aparato detector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que incluye adicionalmente un clasificador de flujos que clasifica células deseadas de células no deseadas.
- 15 20. El sistema de la reivindicación 19, en el que dichas células son espermatozoides.
21. El sistema de la reivindicación 20, en el que dichas células deseadas son una de células de cromosoma X o cromosoma Y.
- 20 22. El sistema de la reivindicación 20, en el que dichas células no deseadas son una de células de cromosoma X o cromosoma Y.
23. Un método de formación de imágenes de un objeto en una célula de flujo de un clasificador de flujos, que comprende:
- 25 producir un haz de salida dirigido hacia una trayectoria de flujo de la muestra en un clasificador de flujos, en el que dicho haz de salida ilumina el objeto en la trayectoria de flujo de la muestra de la célula de flujo;
- 30 en el que la iluminación del objeto produce haces que salen de una lente colectora que proporcionan una distancia predeterminada desde el plano del objeto igual a una longitud focal eficaz de la lente colectora;
- 35 colimar dichos haces que salen de dicha lente colectora en forma de haces muy pequeños que se dividen en forma de haces muy pequeños fuera del eje y haces muy pequeños del eje central, para formar múltiples imágenes del objeto en la forma de luz que sale del plano del objeto a diferentes ángulos con relación a un eje central de dicho clasificador de flujos;
- 40 separar dichos haces muy pequeños que salen de dicha lente colectora usando una pluralidad de espejos o divisores de haces, en forma de dichos haces muy pequeños fuera del eje a lo largo del mismo eje, y en cualquier lado de los haces muy pequeños del eje central; y
- 45 detectar el objeto usando un detector sensible a la luz de cada uno de dichos haces muy pequeños fuera del eje (666L, 666R) y dichos haces muy pequeños del eje central (666C);
- en el que se determina una ubicación lateral de cada uno de los haces muy pequeños colimados principalmente mediante su ángulo desde el plano del objeto.
24. El aparato de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente:
- 50 lentes adicionales (674C) o un orificio (674D) dispuesto donde dichos haces muy pequeños separados salen de dicha lente colectora (664) en forma de dichos haces muy pequeños fuera del eje (666L, 666R).
25. El aparato de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente:
- 55 un divisor de haces (686C) que redirige dichos haces muy pequeños en un campo central (666C) a través de un filtro de emisión (688E) hacia una lente de enfoque (676FC).
26. El aparato de la reivindicación 25, que comprende adicionalmente:
- 60 un filtro de línea láser (688L) dispuesto en dicho eje central (C) que filtra haces muy pequeños dispersados de dicho láser (800) hacia la lente (676C) y el fotodetector (690C).
27. El aparato de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente:
- 65 una lente cilíndrica (698) que enfoca haces muy pequeños individuales (700A-700N) en dicha lente colectora (702K).
28. El aparato de la reivindicación 8, en el que dichos detectores son sustituidos con un conjunto PMT lineal de

múltiples canales (720).

FIG. 1

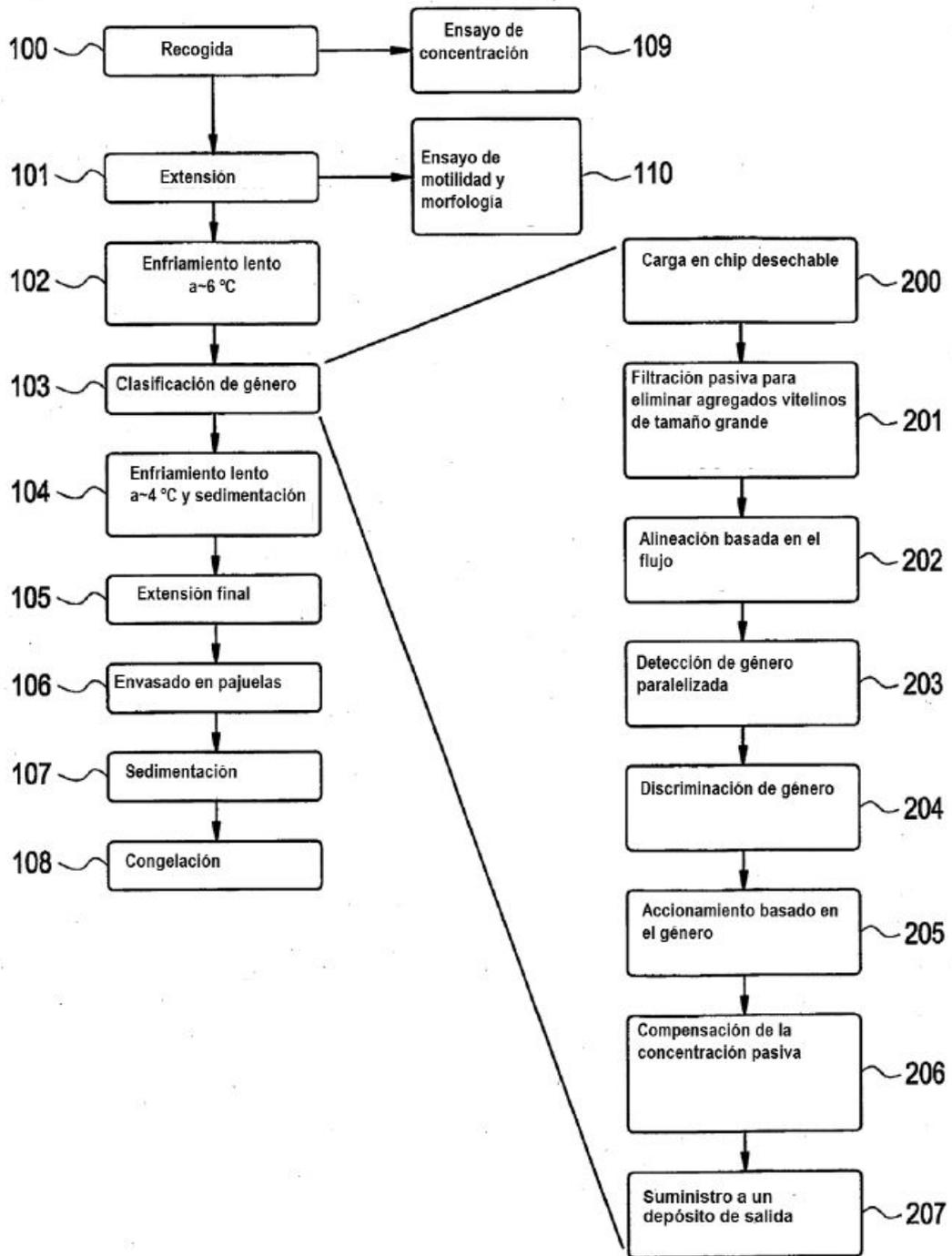


FIG. 2

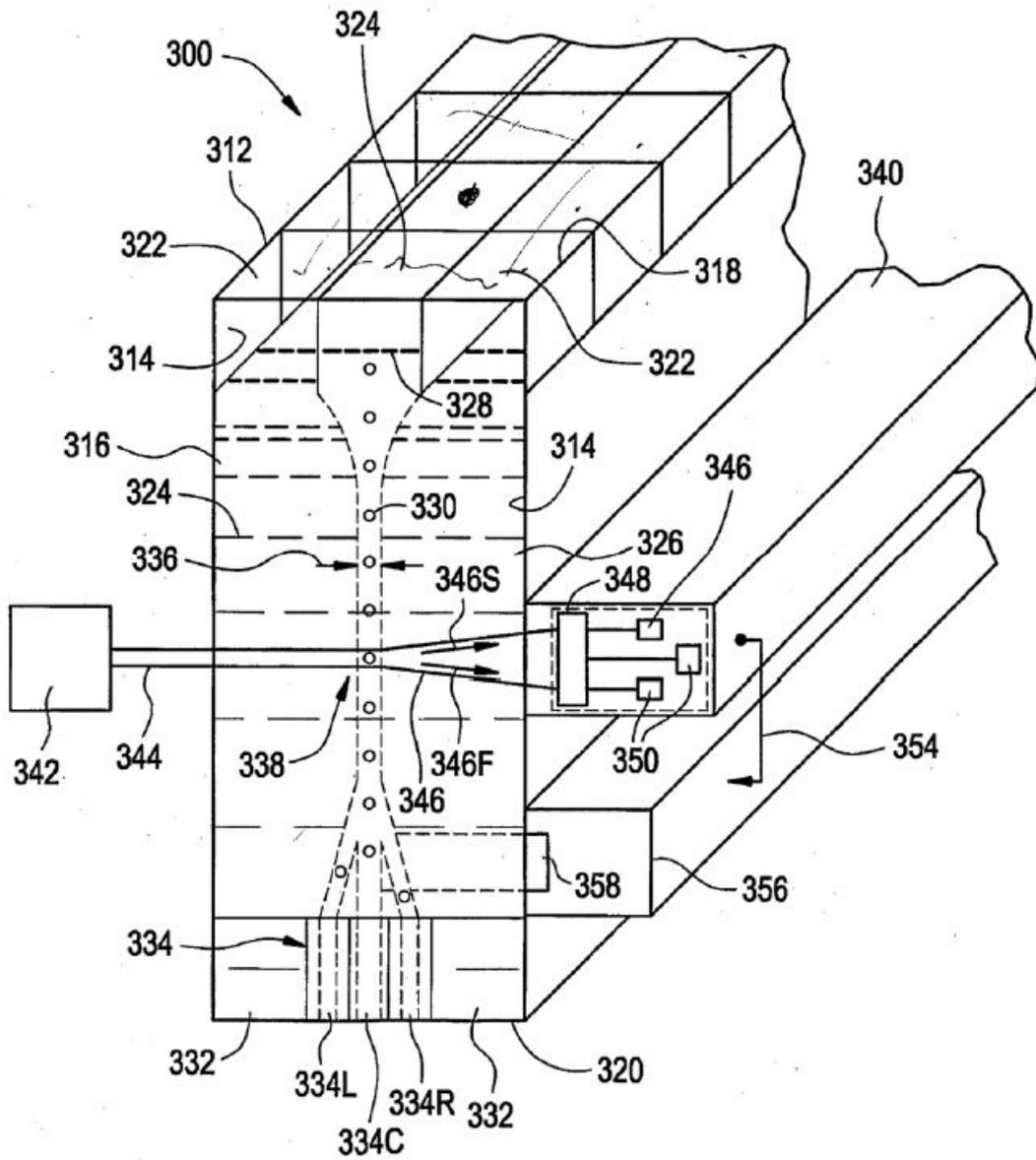


FIG. 3

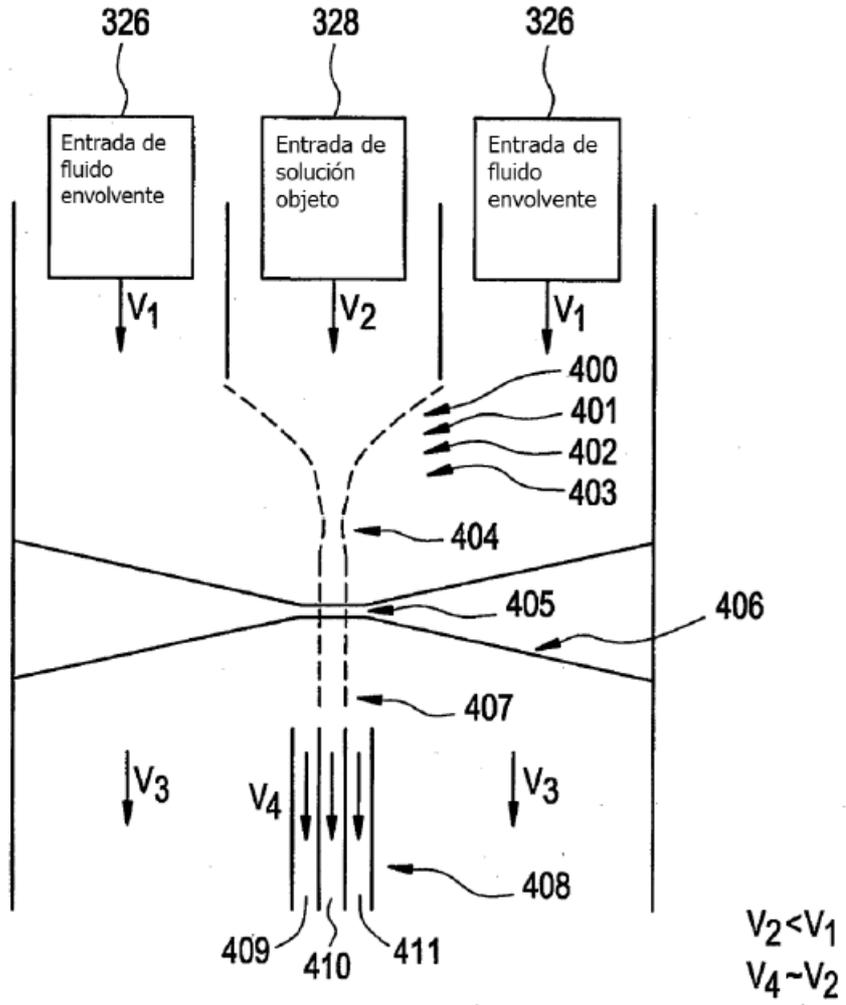


FIG. 4

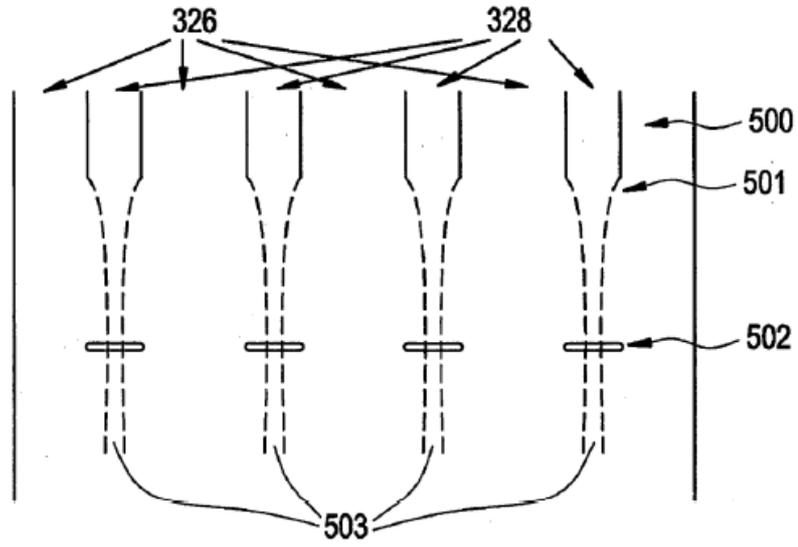


FIG. 4A

Entrada de fluido envolvente								
SF	IS	SF	IS	SF	IS	SF	IS	SF
Entrada de fluido envolvente								

FIG. 5

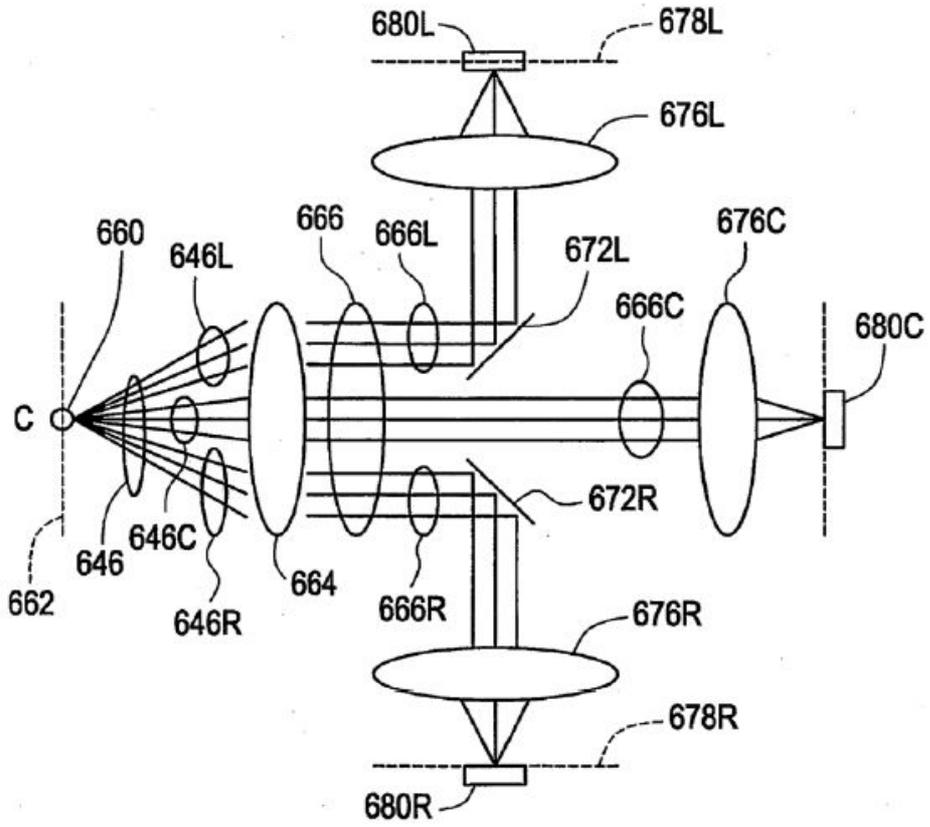


FIG. 5A

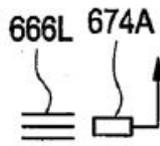


FIG. 5C

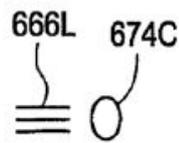


FIG. 5B

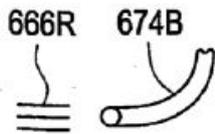


FIG. 5D

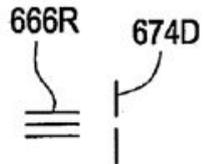


FIG. 6

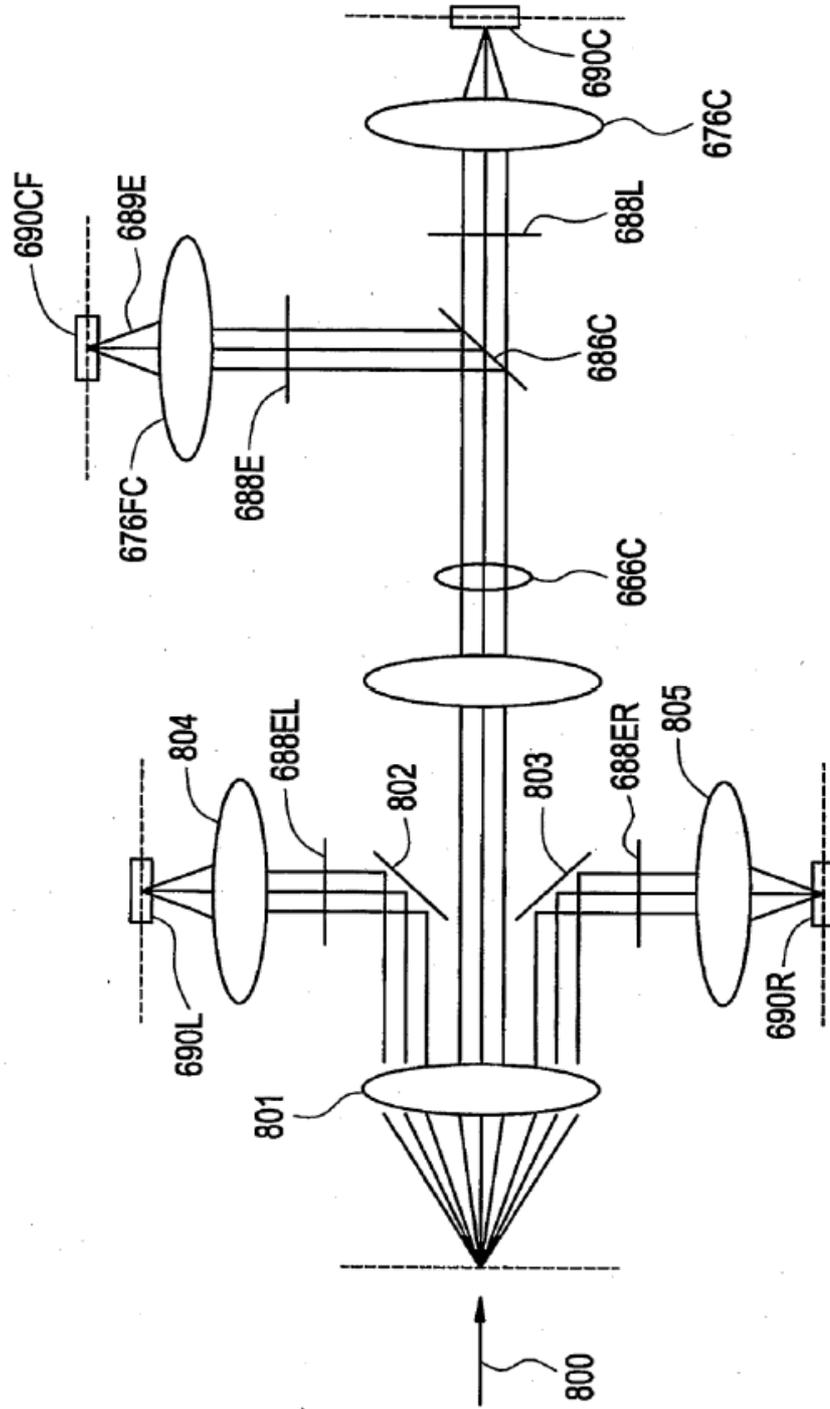


FIG. 7

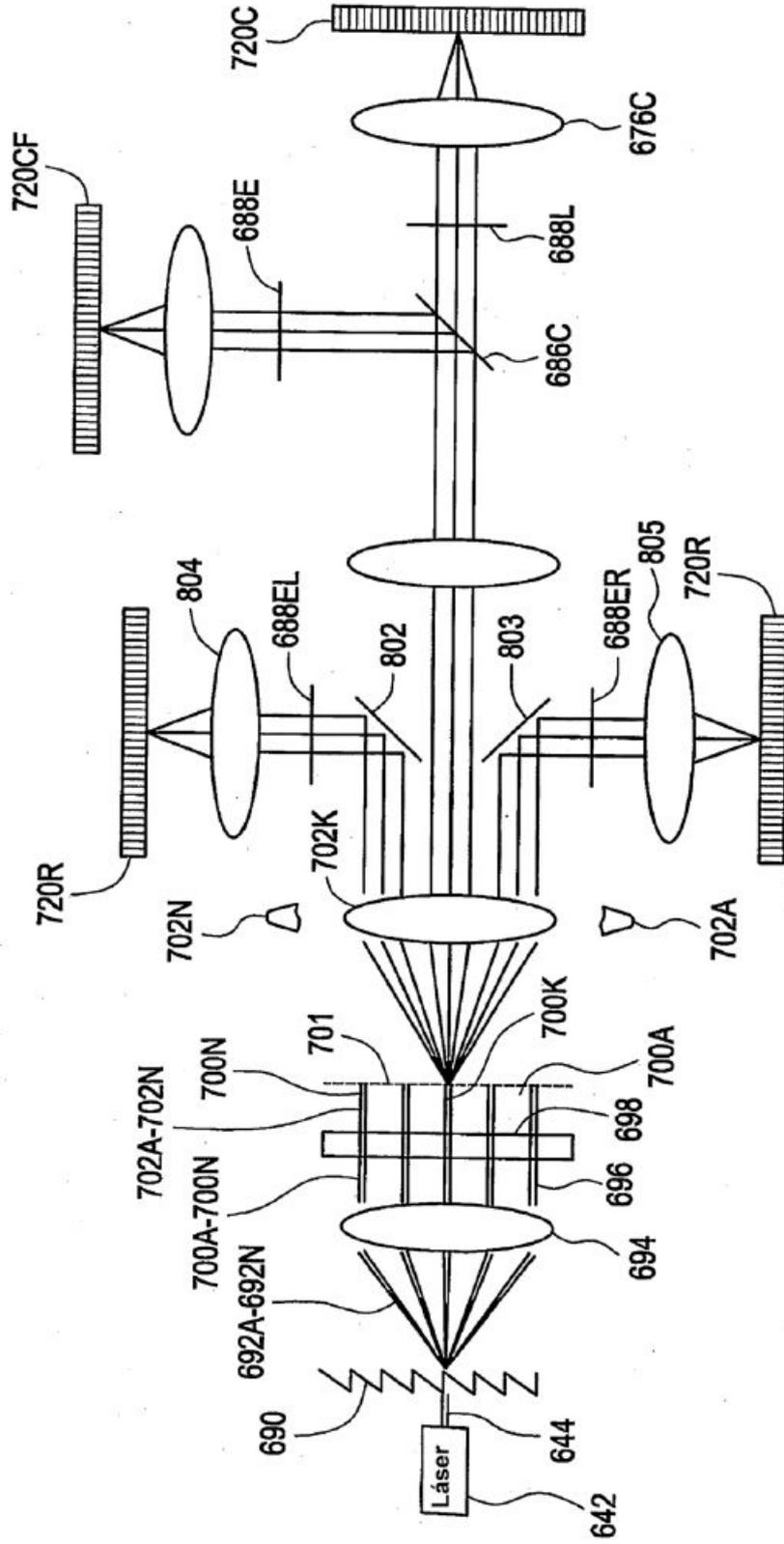


FIG. 8

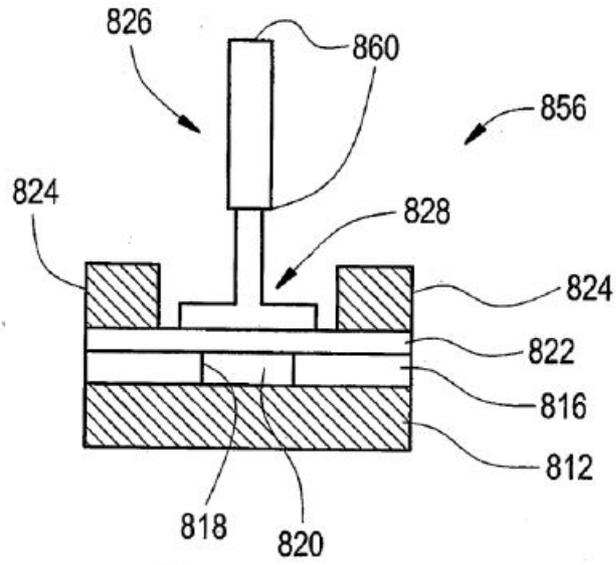


FIG. 9

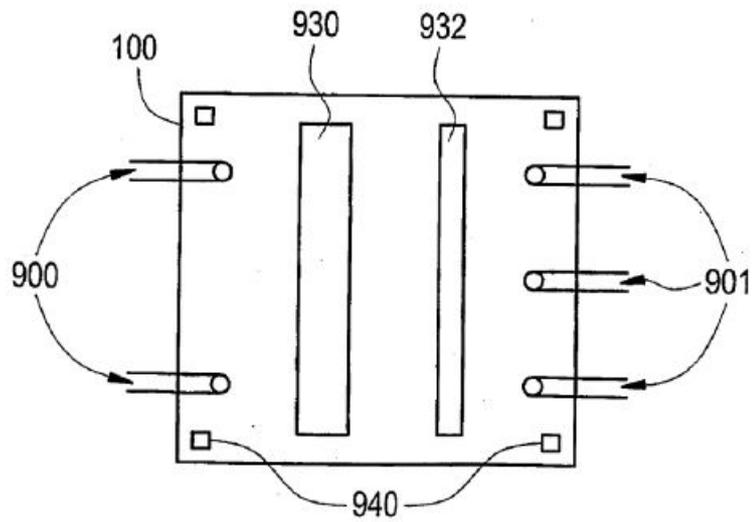


FIG. 10A

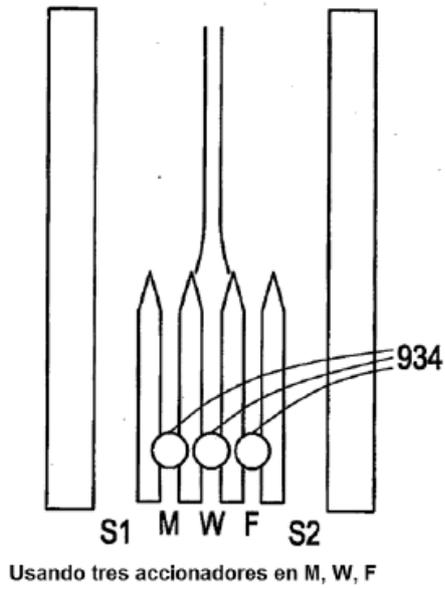


FIG. 10B

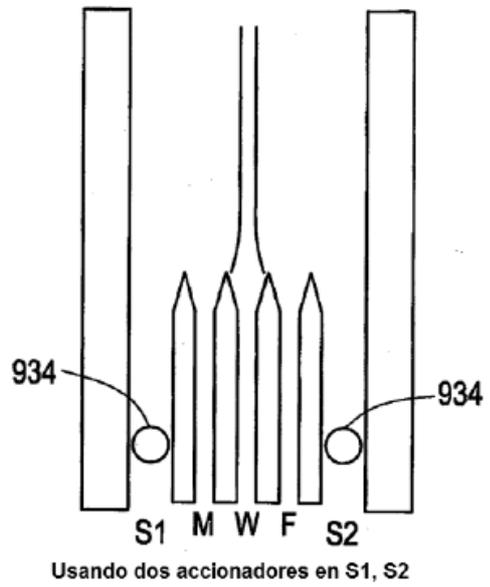


FIG. 10C

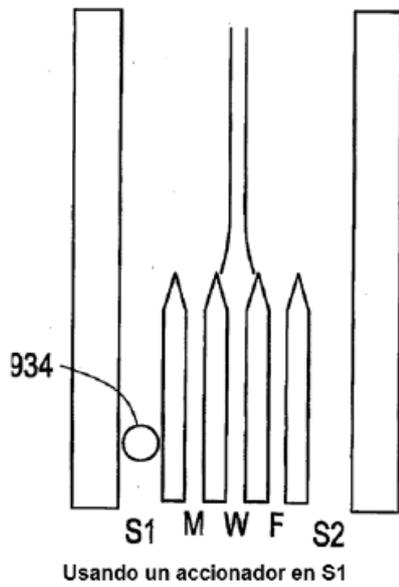


FIG. 10D

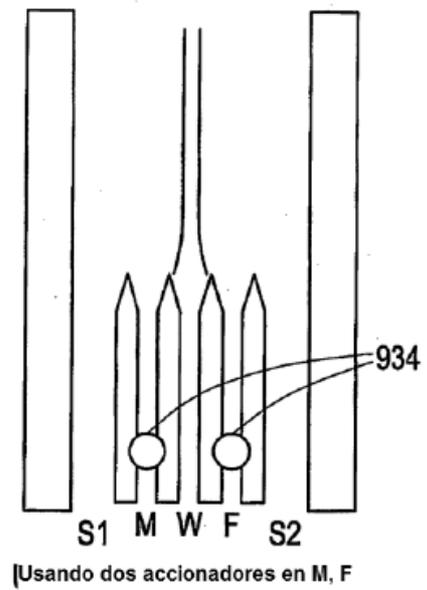
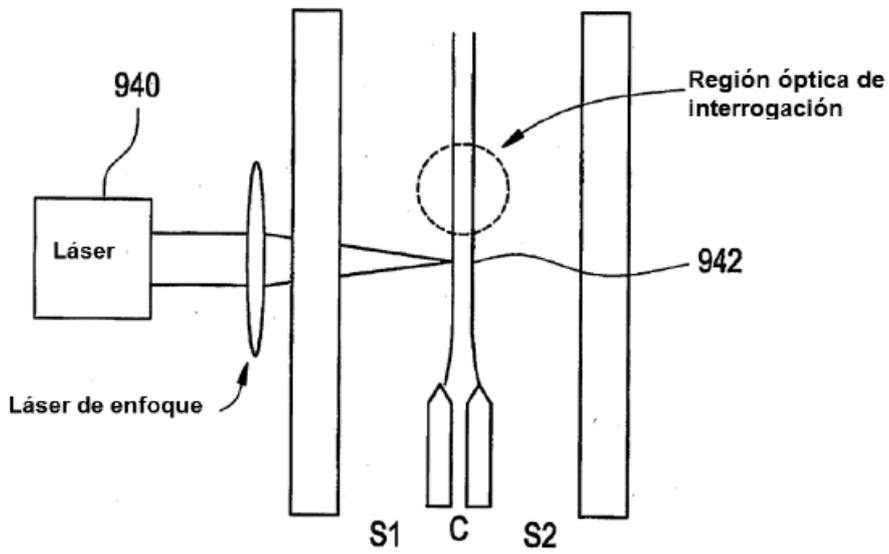
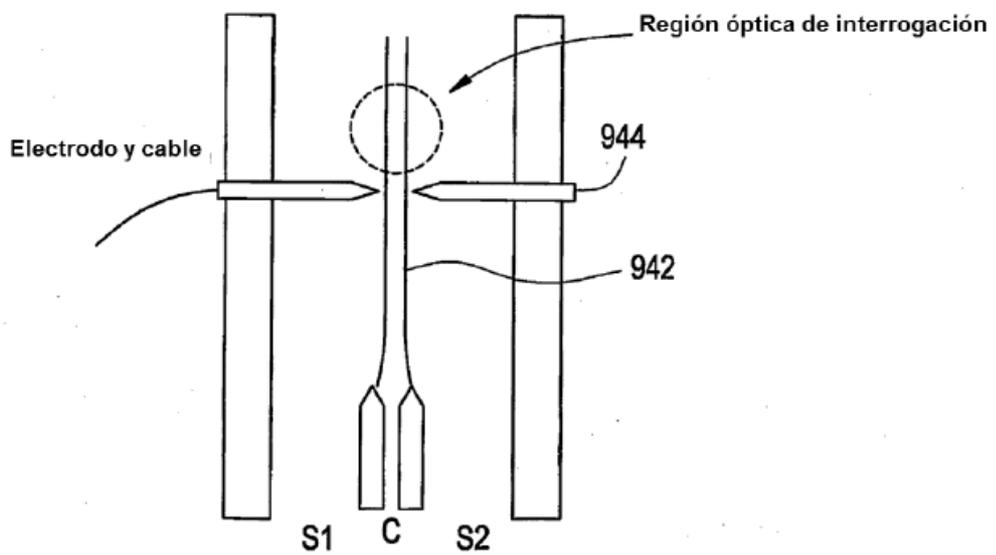


FIG. 11A



Usando destrucción o activación por láser

FIG. 11B



Usando destrucción o activación eléctrica