

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 928 128**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/14** (2006.01)

**C12M 1/34** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2013 PCT/US2013/060730**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14047358**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2013 E 13838116 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2022 EP 2898057**

54 Título: **Sistema de citómetro de flujo con punta de boquilla achaflanada**

30 Prioridad:

**19.09.2012 US 201261703102 P**  
**14.03.2013 WO PCT/US2013/031787**  
**02.07.2013 US 201361842310 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.11.2022**

73 Titular/es:

**INGURAN, LLC (100.0%)**  
**22575 State Highway 6 South**  
**Navasota, TX 77868, US**

72 Inventor/es:

**BUCHANAN, KRIS y**  
**EVANS, KENNETH MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 928 128 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

Sistema de citómetro de flujo con punta de boquilla achaflanada

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere, en general, al campo de la citometría de flujo y, más particularmente, se refiere a sistemas de citómetro de flujo que tienen puntas de boquilla mejoradas que permiten una detección más cerca de un orificio de salida de la boquilla.

Antecedentes

- 10 Se conocen citómetros de flujo para el análisis y la clasificación de partículas y son particularmente adecuados para medir las propiedades físicas y químicas de materiales biológicos, tales como células. Durante el funcionamiento, un citómetro de flujo produce una corriente de fluido que arrastra un fluido de muestra que contiene partículas de interés. Estas partículas pueden inspeccionarse individualmente en la corriente de fluido mediante una diversidad de sistemas sensores o dispositivos de detección para su clasificación.

- 15 Los citómetros de flujo adaptados para la clasificación proporcionan además un mecanismo para aislar subpoblaciones de partículas en base a sus propiedades medidas o determinadas. Los citómetros de flujo de chorro en aire consiguen esta separación mediante la creación y el aislamiento de gotitas cargadas que contienen las partículas de interés. Las gotitas que contienen partículas pueden formarse a partir de la corriente de fluido y pueden cargarse en base a una decisión de clasificación y, a medida que pasan a través de un campo eléctrico producido por placas de desviación, su trayectoria es redirigida a una de entre diversas trayectorias predeterminadas para la recogida. La formación de estas gotitas puede conseguirse en una boquilla de citómetro de flujo.

- 20 Además de la función de formación de gotitas, algunas boquillas de citómetro de flujo incluyen una geometría interior que influye en las partículas para que adopten una orientación uniforme. La función de orientación permite el análisis y la clasificación de células con propiedades esféricas. Como ejemplo, las velocidades a las que los espermatozoides pueden clasificarse en poblaciones enriquecidas por género se han aumentado, en parte, debido al desarrollo de una boquilla de orientación que presenta una mayor parte de los espermatozoides a los detectores en una orientación relativamente uniforme.

25 El documento US2008/0233635A1 describe boquillas conocidas para la separación de espermatozoides.

Sumario de la invención

- 30 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un sistema de citómetro de flujo que comprende un conjunto de boquilla para producir una corriente de fluido con partículas, comprendiendo el conjunto de boquilla una punta de boquilla que comprende: i) un cuerpo cilíndrico que define un eje longitudinal; y ii) un cuerpo troncocónico adyacente al cuerpo cilíndrico en el eje longitudinal y en comunicación de fluido con el cuerpo cilíndrico, en el que el cuerpo troncocónico termina en una superficie plana transversal al eje longitudinal que tiene un orificio de salida de boquilla, y en el que el cuerpo troncocónico comprende además un chaflán en el borde de la superficie plana y el cuerpo troncocónico, definiendo dicho chaflán una parte proximal del cuerpo troncocónico, de manera que dicha parte proximal tenga un primer ángulo de ahusamiento con respecto a dicha superficie plana comprendido entre 15 y 60 grados y en el que la parte distal del cuerpo troncocónico tiene un segundo ángulo de ahusamiento, y en el que el segundo ángulo de ahusamiento es mayor que el primer ángulo de ahusamiento, un láser para producir un haz que incide sobre la corriente de fluido y las partículas, en el que el foco del haz láser en la corriente de fluido se coloca a una distancia no mayor de 300 micrómetros desde el orificio de salida, y un detector para detectar la luz emitida o reflejada desde las partículas en el interior de la corriente de fluido en respuesta al haz.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra un esquema de un citómetro de flujo.

La Fig. 2 ilustra un citómetro de flujo no según la invención, que funciona fuera de una posición vertical ideal en una corriente de fluido.

- 45 La Fig. 3 ilustra una gráfica bivariada obtenida a partir de espermatozoides para clasificación por sexo mediante citómetro de flujo en la configuración de la Fig. 2.

La Fig. 4 ilustra un citómetro de flujo no según la invención, que funciona con una ubicación de interrogación más cercana a una ubicación ideal, pero con cierta oclusión de las emisiones resultantes.

La Fig. 5 ilustra una gráfica bivariada obtenida a partir de espermatozoides para clasificación por sexo mediante

citómetro de flujo en la configuración de la Fig. 4.

La Fig. 6 ilustra un citómetro de flujo no según la invención, que funciona con una ubicación de interrogación cercana a la ubicación ideal, pero con más luz de oclusión reflejada desde la boquilla al orificio.

5 La Fig. 7 ilustra una gráfica bivariada obtenida a partir de espermatozoides para clasificación por sexo mediante citómetro de flujo en la configuración de la Fig. 6.

La Fig. 8 ilustra una realización de un sistema de citómetro de flujo que tiene una boquilla achaflanada que permite que la ubicación de interrogación esté situada cerca de una ubicación ideal sin oclusión.

La Fig. 9 ilustra una gráfica bivariada obtenida a partir de espermatozoides para clasificación por sexo mediante citómetro de flujo en la configuración de la Fig. 8.

10 La Fig. 10 ilustra una parte de un flujo no según la invención, que funciona con una ubicación de interrogación a una distancia particular desde la punta de la boquilla.

La Fig. 11 ilustra una parte de un citómetro de flujo no según la invención, que funciona con una ubicación de interrogación a una distancia particular desde una punta de boquilla.

15 La Fig. 12 ilustra una parte de un citómetro de flujo según la invención, que funciona con una ubicación de interrogación a una distancia particular desde la punta de la boquilla achaflanada.

La Fig. 13 ilustra una vista ampliada del extremo de la punta de la boquilla ilustrada en la Fig. 10.

La Fig. 14 ilustra una vista ampliada del extremo de la punta de la boquilla ilustrada en la Fig. 11.

La Fig. 15 ilustra una vista ampliada del extremo de la punta de la boquilla ilustrada en la Fig. 12.

La Fig. 16 ilustra una vista ampliada de una punta de boquilla no según la invención.

20 La Fig. 17 ilustra una vista ampliada de una punta de boquilla no según la invención.

La Fig. 18 ilustra una vista ampliada de una punta de boquilla no según la invención.

La Fig. 19 ilustra una realización de una punta de boquilla.

La Fig. 20 ilustra una realización de un conjunto de boquilla.

La Fig. 21 ilustra una realización de un conjunto de boquilla.

25 Modo(s) para llevar a cabo la invención

En el campo de la citometría de flujo, las partículas de interés incluyen generalmente una gran diversidad de células. Cada tipo de célula presenta diversas restricciones y limitaciones relacionadas con los parámetros operativos de un instrumento de tipo citómetro de flujo, particularmente cuando el instrumento está configurado para la clasificación. Por ejemplo, las células de gran tamaño requieren un orificio de salida de boquilla más grande, mientras que las células más pequeñas frecuentemente requieren un orificio de salida de boquilla más pequeño. Otras células más pequeñas pueden ser frágiles y pueden requerir un orificio de salida de boquilla más grande, que disminuye la velocidad de las células y forma gotitas más grandes. Otros parámetros operativos, tales como la presión de la muestra y la velocidad de formación de gotitas, pueden depender de la concentración de las células sometidas a procesamiento en combinación con el tamaño de las células. En el caso de la clasificación, las velocidades y las purezas de clasificación deseadas pueden imponer limitaciones adicionales en los parámetros operativos. Además del tamaño de las células, las formas de las células pueden dictar la geometría interior de la boquilla requerida para un sistema de citómetro de flujo de chorro en aire.

Una punta de boquilla estándar puede estar configurada para producir un flujo laminar coaxial de dos fluidos a través de una geometría circular cónica no modificada. La corriente de fluido resultante comprende una corriente de núcleo cilíndrica rodeada por una corriente exterior coaxial. Esta corriente de fluido es muy adecuada para células redondas o semi-redondas. Dicha punta de boquilla no modificada inyecta las células al interior de una forma de núcleo cilíndrico con la misma presión aplicada al núcleo para centrar las células en el interior del núcleo. La geometría no modificada proporciona la misma presión desde todos los lados, forzando a las células a un flujo laminar de una única fila. Debido a que las células redondas o semi redondas presentan un alto grado de simetría, no requieren orientación y pueden ser analizadas de manera apropiada independientemente de su rotación con relación a un láser de interrogación o a los detectores. Por esta razón, la ubicación física a lo largo de la corriente de fluido en la que se realiza la interrogación con láser con relación a la salida de la punta de la boquilla generalmente no es un factor crítico.

Sin embargo, un determinado subconjunto de operaciones de citómetro de flujo requiere boquillas modificadas que tienden a presentar las partículas en una orientación uniforme. Las boquillas modificadas pueden producir un núcleo con forma de cinta mediante la provisión de una presión relativamente elevada en un plano y una presión relativamente baja en un plano transversal. Esta geometría es particularmente adecuada para forzar a las células planas o con forma de paleta a una orientación uniforme. Los ejemplos no limitativos de geometrías de boquilla de orientación modificadas se describen en las patentes US 6.357.307, 6.604.435, 6.782.768 y 6.263.745. Como ejemplo, la clasificación de espermatozoides requiere la diferenciación de diferencias muy pequeñas de un tinte selectivo de ADN. Debido a la forma esférica de las células espermáticas, estas diferencias solo pueden determinarse de manera precisa en células que están orientadas uniformemente orientadas hacia la fuente de excitación para una iluminación completa y de las emisiones desde las células con respecto a un detector.

Además de los diversos factores descritos anteriormente, deben calibrarse diversos aspectos del citómetro de flujo para diferenciar los espermatozoides que contienen el cromosoma X de los espermatozoides que contienen el cromosoma Y. Una característica que debe determinarse es la colocación vertical de la ubicación de interrogación, o el punto del haz, en la corriente de fluido. Una ubicación ideal en la corriente de fluido coincide generalmente con la ubicación en la que el mayor porcentaje de espermatozoides presenta la orientación deseada y la sección más estrecha de la corriente de núcleo. Dicha ubicación ideal puede determinarse empíricamente mientras los espermatozoides se analizan en un análisis de calibración antes de la clasificación.

En muchas boquillas, las ubicaciones de interrogación más cercanas al orificio de salida de la boquilla demuestran un rendimiento cada vez mejor. Bien porque los espermatozoides son células vivas que tienden a no orientarse, o bien porque los espermatozoides se orientan demasiado a medida que continúan por la corriente de fluido, parece que las mediciones son frecuentemente más precisas a medida que la ubicación de interrogación se aproxima a la punta de la boquilla. Sin embargo, a medida que la ubicación de interrogación se aproxima a las puntas de boquilla de orientación actuales, se introducen artefactos que reducen el rendimiento del sistema. En particular, las emisiones de luz reflejadas desde la superficie inferior de las puntas actuales causan artefactos en la señal de detección. En la mayoría de los casos, estos tipos de artefactos reducen el rendimiento del sistema, resultando en una imagen distorsionada y en general reducen las intensidades de las señales detectadas. En ausencia de dichos artefactos, la colocación vertical de la zona de interrogación más cerca de una punta de boquilla puede ser posible y puede resultar en una mejor resolución, así como en velocidades de clasificación más rápidas con pérdidas mínimas en la calidad de la señal.

A diferencia de las boquillas de orientación, las células redondas o semi-redondas típicas pueden alinearse en el interior de las boquillas estándar en una mayor gama de posiciones verticales sin reducir la calidad de la señal. Dicho de otra manera, las células redondas pueden ser interrogadas con la misma eficacia en un intervalo vertical relativamente grande en la corriente de fluido en comparación con las células que requieren orientación.

Con referencia a la Fig. 1, se ilustra un sistema (10) de citómetro de flujo que incorpora una punta (46) de boquilla modificada según las reivindicaciones.

El sistema (10) de citómetro de flujo incluye una fuente (12) de células para producir una corriente de fluido que contiene partículas de interés. El flujo de muestra se deposita en el interior de un conjunto (14) de boquilla y se introduce o se hace fluir en una corriente (16) de fluido de fluido (18) envolvente. El fluido (18) envolvente puede ser suministrado por una fuente (20) de fluido envolvente de manera que, a medida que la fuente (12) de células suministra las partículas al fluido (18) envolvente, son alimentados simultáneamente a través del conjunto (14) de boquilla. El fluido (18) envolvente puede suministrarse a un caudal envolvente que está determinado por una presión envolvente aplicada en la fuente (20) de fluido envolvente. De esta manera, el fluido (18) envolvente forma una corriente (16) de fluido que rodea coaxialmente la muestra que tiene partículas que sale desde el conjunto (14) de boquilla a través de la punta (46) de boquilla en el orificio (44) de salida de boquilla. Un oscilador (24) puede ser controlado de manera precisa con un control (26) de oscilador, para producir ondas de presión en el interior del conjunto (14) de boquilla y las ondas de presión pueden transmitirse a los fluidos que salen desde el conjunto (14) de boquilla en el orificio (44) de salida de boquilla. En respuesta a las ondas de presión, la corriente (16) de fluido que sale desde el orificio (44) de salida de boquilla eventualmente forma gotitas (28) regulares a intervalos precisos. La frecuencia y, en cierta medida, la forma de las gotitas formadas, pueden controlarse mediante una frecuencia de accionamiento de gotas y una amplitud de accionamiento de gotas suministradas al oscilador (24) o al controlador (26) de oscilador.

Cada gotita, formada de esta manera, retiene el fluido envolvente y la muestra que previamente formaron una parte de la corriente (16) de fluido. Debido a que las células suministradas desde la fuente (20) de células están rodeadas por la corriente (16) de fluido o el entorno de fluido envolvente, idealmente, las gotitas (28) contienen células aisladas individualmente. Sin embargo, la concentración de la muestra, la presión de la muestra y otros parámetros del instrumento determinan la frecuencia con la que múltiples células ocuparán regularmente una única gotita, así como el porcentaje de gotitas que contienen células espermáticas.

El citómetro (10) de flujo actúa para clasificar las gotitas en base a las características de las células que se prevé que

estén contenidas en el interior de las gotitas. Esto puede conseguirse mediante un sistema (30) de detección de células en comunicación con un analizador (36). El sistema (30) de detección de células incluye al menos un sensor, o detector, (32) sensible a las células contenidas en el interior de la corriente (16) de fluido. El sistema (30) de detección de células proporciona datos al analizador (36), el cual puede causar una acción dependiendo de la presencia relativa o la ausencia relativa de una característica de las células en la corriente (16) de fluido. Determinadas características, tales como el contenido de ADN relativo de las células espermáticas, pueden detectarse mediante excitación con un láser que genera un haz de irradiación al cual son sensibles las células. Como un ejemplo no limitativo, las células pueden ser células espermáticas teñidas con Hoechst 33342, y el láser (34) puede funcionar a una longitud de onda UV, tal como a aproximadamente 355 nm. Un ejemplo de dicho láser puede ser un Vanguard 350 (disponible en Spectra-Physics), que funciona a 350 mW. Pueden emplearse diversos elementos ópticos para conformar el perfil de haz del láser, dividir el haz en más de una corriente o reducir la potencia del haz en una corriente. Pueden encontrarse ejemplos no limitativos de dichas ópticas en los documentos WO/2004/104178 y WO/2001/85913.

En el caso de los espermatozoides, la presencia de un cromosoma X o un cromosoma Y puede determinarse a partir de la fluorescencia detectada producida en respuesta al láser (34). En particular, las configuraciones del sistema (30) de detección de células pueden estar en comunicación con un analizador para proporcionar una diversidad de información de fluorescencia, tal como la fluorescencia frontal de un evento, la fluorescencia lateral de un evento o la cantidad de dispersión asociada con un evento. El analizador (36) puede incluir instrucciones escritas para analizar las señales producidas por los uno o más sensores (32) en el sistema (30) de detección de células. El tinte fluorescente selectivo de ADN se une estequiométricamente al ADN espermático. Debido a que los espermatozoides con cromosoma X contienen más ADN que los espermatozoides con cromosoma Y, los espermatozoides con cromosoma X pueden unirse a una mayor cantidad de tinte fluorescente selectivo de ADN que los espermatozoides con cromosoma Y. De esta manera, midiendo la fluorescencia emitida por el tinte unido tras la excitación, es posible diferenciar entre espermatozoides que contienen X y espermatozoides que contienen Y. El analizador (36) puede diferenciar entre distinciones, tales como espermatozoides que son viables o no viables, además de espermatozoides orientados y no orientados, según la lógica de clasificación incorporada con las regiones de selección.

Con el fin de conseguir la separación y el aislamiento en base a las características de los espermatozoides teñidos, el sensor (32) puede detectar la luz emitida y la información puede suministrarse a un analizador (36) acoplado a un cargador de gotitas que carga cada gotita (28) de manera diferencial en base a las características de los espermatozoides teñidos contenidos en el interior de esa gotita (28). De esta manera, el analizador (36) actúa para permitir que las placas (38) de desviación electrostática desvíen las gotitas (28) en base a si contienen o no la partícula o la célula apropiada.

Como resultado, el citómetro (10) de flujo actúa para separar los espermatozoides teñidos causando que las gotitas (28) que contienen espermatozoides sean dirigidas a uno o más recipientes (40) de recogida. Por ejemplo, cuando el analizador diferencia las células espermáticas en base a una característica de las células espermáticas, las gotitas que transportan espermatozoides con cromosomas X pueden cargarse positivamente y, de esta manera, se desvían en una dirección, mientras que las gotitas que transportan espermatozoides que contienen cromosomas Y pueden cargarse negativamente y, de esta manera, se desvían en la otra dirección, y la corriente desechada (es decir, las gotitas que no transportan una partícula o célula o que transportan células no deseadas o no absorbibles) puede dejarse sin carga y, de esta manera, se recoge en una corriente no desviada en un tubo de succión o similar. De manera alternativa, puede recogerse uno de entre los espermatozoides que contienen el cromosoma X o los espermatozoides que contienen el cromosoma Y, mientras que el otro se desecha con los desechos.

Un controlador (42) puede formar una parte del analizador (36) o puede ser un componente externo al analizador (36). El controlador (42) ilustrado puede representar también una colección de controladores individuales. El controlador (42) puede recibir señales o instrucciones desde el analizador (36) y, en respuesta, puede modificar uno o más parámetros del instrumento, tales como el caudal de la muestra, la presión de la muestra, el caudal envolvente, la presión envolvente, la frecuencia de accionamiento de gotas o la amplitud de accionamiento de gotas y similares. El controlador (42) puede proporcionar también una interfaz para entradas de operador para ajustar manualmente el caudal de la muestra, la presión de la muestra, el caudal envolvente, la presión envolvente, la frecuencia de accionamiento de gotas, la amplitud de accionamiento de gotas y similares. El analizador (36) puede incluir instrucciones escritas para modificar los parámetros del instrumento en respuesta a los parámetros de clasificación medidos, o las modificaciones a los parámetros del instrumento pueden ser realizadas manualmente por un operador que ajusta varias configuraciones. Las modificaciones en los parámetros del instrumento pueden realizarse en el analizador (36), tal como para cambiar la lógica de clasificación, la lógica de interrupción, regiones de clasificación o regiones de selección y otros parámetros específicos para la adopción de decisiones de clasificación en el analizador. Un controlador (42) puede realizar modificaciones adicionales en los parámetros del instrumento, que pueden controlar diversos componentes externos al analizador, tales como controlar la presión de la muestra, el caudal de la muestra, la presión envolvente, el caudal envolvente, la frecuencia de accionamiento de gotas y la amplitud de accionamiento de gotas.

La Fig. 2 ilustra una parte de un sistema (10) de citómetro de flujo no según la invención, que incluye una punta (45) de boquilla de orientación no modificada que tiene un orificio (44) de salida de boquilla en una superficie (62) inferior plana. Se ilustra una fuente (34) de radiación electromagnética que produce un haz (54) láser en el intervalo de longitud de onda de 355 nm que se enfoca en una ubicación (60) de interrogación en la corriente (16) de fluido a cierta distancia por debajo de la punta (45) de la boquilla. La ubicación (60) de interrogación puede observarse en una ubicación vertical debajo de un intervalo (64) de ubicaciones ideal indicado. Las emisiones (68), o la radiación electromagnética emitida o reflejada desde las células interrogadas en la ubicación (60) de interrogación, se ilustran como rayos divergentes que se recogen en una lente (50) objetivo y se enfocan a través de un orificio (52) en una tira de orificio a un filtro (58) óptico y un sensor, que puede ser un detector (32), tal como un tubo fotomultiplicador (PMT). Pueden emplearse también, de maneras conocidas, disposiciones de detectores. Por ejemplo, en el campo de la clasificación de espermatozoides, pueden colocarse detectores de fluorescencia ortogonales en las ubicaciones frontal y lateral.

La Fig. 3 ilustra una gráfica bivariada que representa información producida desde el sistema (10) de citómetro de flujo parcialmente ilustrado en la Fig. 2. La gráfica bivariada puede generarse manipulando las señales producidas por uno o más detectores que detectan las emisiones de fluorescencia desde las células en la corriente de fluido. La gráfica bivariada ilustrada se genera durante el proceso de clasificación por sexo de los espermatozoides y representa una altura de pico en un eje y un área integrada en el otro eje detectada a partir de una población de espermatozoides teñidos. En la gráfica bivariada, pueden observarse dos subpoblaciones emergentes. Aunque existe cierta superposición, estas poblaciones pueden seleccionarse y clasificarse en una o más poblaciones. En la operación de clasificación de espermatozoides, R2 representa una región de selección que incluye espermatozoides a ser clasificados como espermatozoides vivos con cromosoma X. Sin embargo, la resolución y la intensidad de señal observadas en la Fig. 3 pueden ser subóptimas y pueden requerir que el sistema de citómetro de flujo se haga funcionar a velocidades más bajas con el fin de conseguir una pureza deseada y/o un rendimiento deseado.

La Fig. 4 ilustra el sistema (10) de citómetro de flujo similar al de la Fig. 2, excepto que el haz (54) láser se ha movido en el interior del intervalo (64) de ubicaciones ideal (al que puede hacerse referencia también como el intervalo ideal de posiciones verticales). Con propósitos ilustrativos, este intervalo (64) de ubicaciones ideal coincide con la ubicación en la que se inicia la oclusión de algunas de las emisiones (68). Además de las emisiones (68), se ilustra una emisión (70) secundaria representativa reflejada desde la superficie (62) plana de la punta (45) de boquilla no modificada y a través de la lente (50) objetivo. La Fig. 5 ilustra una gráfica bivariada representativa de las señales producidas por la configuración ilustrada en la Fig. 4. Aunque no es fácilmente evidente a partir de la gráfica bivariada, las intensidades máximas generales pueden ser más bajas para ambas poblaciones de espermatozoides debido a la oclusión. Además, debido a la naturaleza divergente de la luz fluorescente, cierta fracción de luz reflejada puede estar entrando en el orificio, resultando en ruido y/o distorsión.

Con referencia ahora a la Fig. 6, la ubicación (60) de interrogación se mueve todavía más cerca de la punta (45) de boquilla no modificada. La reducción adicional de esta distancia entre la ubicación (60) de interrogación y la punta (45) de la boquilla resulta en un aumento tanto de la oclusión de las emisiones (68) como de la cantidad de emisiones (70) secundarias reflejadas desde el fondo (62) plano de la punta (45) de la boquilla. En el campo de la clasificación de espermatozoides, se ha observado que, a cierta distancia, la geometría de la lente objetivo y la punta de la boquilla puede colocar realmente las emisiones secundarias directamente en el orificio (52) con una temporización ligeramente diferente, causando distorsión. La Fig. 7 ilustra un lote bivariado, al igual que la Fig. 5, pero con un alto grado de distorsión. Cada una de las poblaciones típicas de espermatozoides con cromosomas X e Y se asemeja a dos poblaciones, dejando una apariencia de cuatro poblaciones. En ciertos instrumentos de citómetro de flujo pueden resultar dos poblaciones adicionales a partir de estas emisiones secundarias que llegan al detector después de un ligero retardo.

La Fig. 8 ilustra una configuración con una punta (46) de boquilla modificada que tiene una superficie (62') plana de área reducida y un recorte (88) en forma de un chaflán (90). Estas características abordan un problema no reconocido anteriormente eliminando una parte de la superficie plana responsable de ocluir las emisiones (68) y de reflejar las emisiones (70) secundarias. La punta (46) de boquilla modificada está achaflanada tal como se define en la reivindicación 1.

La Fig. 8 ilustra la ubicación (60) de interrogación colocada en o cerca de la ubicación ideal y en la misma ubicación que la ilustrada en la Fig. 6, con emisiones (70) secundarias mínimas reflejadas debido a la geometría de la superficie (62') inferior. Las emisiones (70) secundarias reflejadas ya no tendrán la trayectoria geométrica anterior disponible para el orificio (52). En cambio, la lente (50) objetivo captura directamente una mayor parte de la luz (68) emitida desde la ubicación (60) de interrogación.

Tal como se observa en la Fig. 9, la gráfica bivariada resultante ilustra dos poblaciones de espermatozoides distintas. De esta manera, la punta de boquilla modificada permite el funcionamiento normal del citómetro de flujo en un intervalo de posiciones aumentado para el punto de haz, que incluye un intervalo más cercano a la punta de boquilla que proporciona un rendimiento mejorado.

Tal como se usa en el presente documento, debe entenderse que el término "truncocónico" describe la forma general de un cono truncado.

Debe entenderse que la expresión "cuerpo truncocónico" describe un cuerpo que tiene la forma general de un cono truncado.

- 5 Puede entenderse que la expresión "cuerpo cilíndrico" describe un cuerpo que tiene la forma general de un cilindro, pero pretende incluir variaciones menores respecto a la definición matemática estricta de dicha forma y puede incluir variaciones que incluyen muescas, ranuras, rebordes, bordes redondeados, chaflanes y otras alteraciones.

10 Tal como se usa en el presente documento, debe entenderse que el término "recorte" hace referencia a la superficie de un objeto que tiene la apariencia de que el material contiguo ha sido cortado, o rasurado, o si no retirado en esa superficie. Sin embargo, esa superficie puede formarse mediante cualquier número de técnicas y no es necesaria una eliminación física de material. Por ejemplo, una pieza puede formarse a partir de moldeo por inyección o con una impresora 3-D y cualquiera de ellas puede tener una superficie con la apariencia de un chaflán, un filete u otra ranura y esta superficie puede considerarse un "recorte", tal como se usa en el presente documento.

15 Con referencia ahora a las Figs. 10-12, se ilustra un haz (54) láser que interactúa con tres puntas de boquilla diferentes a la misma distancia. Las puntas de boquilla mostradas en las Figuras 10 y 11 son no según la presente invención.

20 La Fig. 10 ilustra una punta (45) de boquilla no modificada que tiene una superficie de fondo plano. La Fig. 11 ilustra otra punta (45) de boquilla no modificada que tiene una superficie de fondo plano, pero que tiene una transición redondeada a la superficie de fondo plano. Cada punta de boquilla produce una corriente de fluido que es inspeccionada en una zona de interrogación en la misma ubicación. La emisión (68) es el resultado de la interrogación de una célula, o una célula teñida, con radiación electromagnética en la zona de interrogación. Las emisiones (68) se ilustran como un cono de emisiones representativo que tiene un ángulo de  $\theta$ . El ángulo del cono de emisión puede ser de aproximadamente 30 grados en cada dirección.

25 En la Fig. 10, la punta (45) de boquilla no modificada se ilustra con una superficie (62) plana relativamente grande. A la distancia ilustrada, las emisiones (68) desde las partículas en la corriente (16) de fluido se reflejan en la superficie (62) plana de la punta (45) de la boquilla. De manera similar, en la Fig. 11, una punta (45) de boquilla no modificada tiene características más curvas, pero todavía tiene una superficie (62) plana relativamente grande que refleja las emisiones (70) secundarias desde las partículas en la corriente (16) de fluido. El extremo de las boquillas redondeadas existentes que tienen geometrías internas para orientar las células sigue siendo una superficie plana. Incluso en estas puntas redondeadas, la superficie de fondo plano ocupa un área suficiente para distorsionar las mediciones tomadas en una proximidad cercana a la punta (45) de boquilla no modificada.

30 Según una realización de la invención, la Fig. 12 ilustra una punta (46) de boquilla modificada que tiene un cuerpo (80) cilíndrico que define un eje longitudinal. Un cuerpo (84) truncocónico está adyacente al cuerpo (80) cilíndrico a lo largo del eje longitudinal y está en comunicación de fluido con el cuerpo cilíndrico. Un recorte (88) en la punta del cuerpo (84) truncocónico tiene la forma de un chaflán (90) dejando una superficie plana con un área mínima. La superficie (62) plana puede tener un área reducida en comparación con las boquillas anteriores, particularmente la boquilla anterior con geometrías de orientación. Esta geometría modificada acomoda todo el cono (68) de emisiones completo sin oclusión y sin producir una emisión (70) secundaria, lo que permite que las mediciones se tomen más cerca de la punta (46) de boquilla modificada que las puntas (45) de boquilla no modificadas de las Figs. 10 y 11.

40 La Fig. 13 ilustra una vista extremadamente cercana de la superficie (62) plana en la parte inferior de la punta (45) de boquilla no modificada vista en la Fig. 10. Una región (94) exterior representa el área en la superficie plana responsable de ocluir las emisiones y de reflejar las emisiones secundarias a una distancia particular desde la boquilla. Mientras, la región (92) central, representa el área en la superficie inferior que no ocluye las emisiones ni refleja las emisiones secundarias a una distancia particular desde la boquilla. En algunas realizaciones de una punta (46) de boquilla modificada, la punta (46) de boquilla modificada puede estar provista de una superficie (62') plana de área reducida que tiene la misma área superficial que la región (92) central ilustrada.

45 De manera similar, la Fig. 14 ilustra la parte inferior misma de una punta (45) de boquilla redondeada no modificada, similar a la que se observa en la Fig. 11. La región (94) exterior correspondiente incluye menos área que en la Fig. 13, pero una parte significativa de la superficie (62) plana todavía es problemática cuando se intenta interrogar una corriente de fluido en una posición cercana a la punta de la boquilla.

50 La Fig. 15 ilustra el extremo mismo de una punta (46) de boquilla modificada, similar a la que se observa en la Fig. 12, que puede estar caracterizada como el extremo distal de un cuerpo (84) truncocónico. El cuerpo (84) truncocónico puede considerarse un único cuerpo (84) truncocónico que tiene una punta (90) achaflanada, o puede considerarse un primer cuerpo truncocónico que tiene un primer ángulo de ahusamiento adyacente a y continuo con un segundo cuerpo truncocónico que tiene un segundo ángulo de ahusamiento. El segundo ángulo puede ser una conicidad más agresiva

para reducir el tamaño de la superficie de fondo plano que tiene el orificio (44) de salida de boquilla.

La Fig. 16 ilustra una punta (46) de boquilla modificada alternativa no según la invención en la que un recorte (88) se asemeja a una punta redondeada que termina en una superficie de fondo plano con un área (62') reducida. Este recorte (88) ilustrado puede estar caracterizado también como un filete (124) cóncavo que termina en una superficie inferior que tiene un área (62') reducida.

La Fig. 17 ilustra una punta (46) de boquilla modificada alternativa no según la invención en la que un recorte (88) tiene la forma de un filete (126) cóncavo. El filete (126) cóncavo termina en un área (62') reducida que proporciona beneficios similares a los conferidos por las geometrías modificadas ilustradas en las Figs. 12 y 15.

La Fig. 18 ilustra una punta de boquilla modificada alternativa no según la invención en la que el recorte tiene la forma de una ranura (128) perpendicular que resulta en la apariencia de un segundo cuerpo cilíndrico en comunicación con el cuerpo (84) troncocónico. De manera alternativa, el segundo cuerpo cilíndrico puede tener una base más ancha que la superficie de fondo plano de área (62') reducida, que puede estar caracterizada como un segundo cuerpo troncocónico, pero no un chaflán similar al de la Fig. 15.

La Fig. 19 ilustra una vista en perspectiva y una vista en sección de una punta (46) de boquilla modificada que tiene un recorte (88) en forma de un chaflán (90) y una superficie interior configurada para orientar las partículas. El recorte (88) ilustrado tiene la forma de un chaflán (90). La superficie exterior de la punta (46) de boquilla puede estar caracterizada como un cuerpo (80) cilíndrico adyacente a, y en comunicación de fluido con, un cuerpo (84) troncocónico a lo largo de un eje (82) longitudinal. Además, puede haber muescas (120) o ranuras formadas en la superficie exterior del cuerpo (80) cilíndrico con el propósito de asegurar la punta (46) de boquilla con un conjunto de boquilla y/o para alinear la punta (46) de boquilla de orientación en el interior de un conjunto de boquilla. La parte inferior de la superficie exterior ilustrada puede estar caracterizada como un cuerpo (84) troncocónico que termina en un chaflán (90), o puede estar caracterizada como una parte proximal del cuerpo troncocónico que tiene un primer ángulo de ahusamiento adyacente a una parte distal del cuerpo troncocónico que tiene un segundo ángulo de ahusamiento; siendo el segundo ángulo de ahusamiento más pronunciado que el primer ángulo de ahusamiento.

Con referencia al interior de la punta (46) de boquilla de orientación, se forma una boca (102) generalmente circular a una cavidad de punta de boquilla a lo largo del eje (82) longitudinal. La superficie interior de la punta (46) de boquilla puede realizar una transición desde un perfil circular, o casi circular, a un perfil cada vez más elíptico a lo largo de una región (100) elípticamente creciente. La relación del eje mayor con relación al eje menor puede aumentar hasta una demarcación (104) elíptica, después de lo cual el perfil elíptico de la superficie interior puede realizar una transición de vuelta a un perfil circular a lo largo del eje (82) longitudinal en una región (106) elípticamente decreciente. La región (106) elípticamente decreciente puede terminar en una demarcación (108) circular seguida a lo largo del eje (82) longitudinal por una región (110) cónica. La región (110) cónica puede terminar en una segunda demarcación (112) circular que inicia una región (114) cilíndrica que termina en el orificio (44) de salida de boquilla.

Una vista más cercana del extremo de la punta (46) de boquilla ilustra la región (110) cónica interior además de la región (114) cilíndrica en el interior de la punta (46) de boquilla, así como el recorte (88) en forma de un chaflán (90). El orificio (44) de salida de boquilla puede verse también en esta vista formado en la superficie (62') de fondo plano que es transversal al eje (82) longitudinal.

Una realización se refiere a la incorporación de la punta de boquilla achaflanada a un conjunto de boquilla alternativo. Un ejemplo de un conjunto de boquilla alternativo puede incluir un tubo de inyección recto asentado con una parte del conjunto de boquilla. La reducción de la longitud total del tubo de inyección facilita el control de la longitud y de la posición radial de la salida de inyección. Los tubos de inyección anteriores incluían frecuentemente tubos de inyección metálicos que se doblaban en el interior del conjunto de boquilla o que se enderezaban a partir de material enrollado o curvo. Independientemente de si se introducen en una etapa de bobinado previa a la fabricación o justo antes del despliegue en una boquilla de citómetro de flujo, dichas curvaturas resultan en pliegues o irregularidades en el interior del tubo de inyección y pueden crear además incertidumbres posicionales del eje central del tubo de inyección con respecto al eje de flujo deseado en el interior de una boquilla. Estos pliegues e irregularidades pueden inhibir el flujo de fluido laminar o pueden redirigir el flujo de muestra, lo que puede tener un impacto negativo sobre las características de rendimiento del conjunto de boquilla; particularmente si se desean características de orientación. En otro aspecto, el tubo de inyección sobremoldeado descrito en el presente documento puede presentar una superficie continua o enrasada en cualquier punto de conexión.

Diversos conjuntos de boquillas anteriores incluían frecuentemente conectores que presentaban volúmenes muertos en la trayectoria de flujo. Estos volúmenes muertos pueden convertirse en acumulaciones de fluido estancado que pueden albergar bacterias perjudiciales para la muestra y que pueden ser difíciles de limpiar. Mediante sobremoldeo por inyección de un tubo de inyección en el conjunto de boquilla puede conseguirse una longitud y una posición precisas y repetibles, proporcionando de esta manera unos medios fiables para la fabricación de conjuntos de boquilla con



características de rendimiento precisas y reproducibles. Además, el sobremoldeo puede proporcionar unos medios para reducir o eliminar espacios muertos en diversas conexiones. Los elementos adicionales pueden sobremoldearse, o moldearse por inyección, con diversas partes del conjunto de boquilla para reducir la cantidad de potenciales espacios muertos, así como el número de conexiones con posibilidad de fugas.

Con referencia ahora a la Fig. 20, se ilustra un sistema de citómetro de flujo que incorpora un ejemplo de un conjunto (210) de boquilla. El conjunto (210) de boquilla puede incorporarse en el cabezal de clasificación de cualquier número de clasificadores de gotitas disponibles comercialmente, tales como citómetros de flujo de chorro en aire. El conjunto (210) de boquilla puede incluir una carcasa (212) de boquilla que contiene una cavidad (214) de boquilla. La carcasa (212) de boquilla puede construirse a partir de una única pieza de carcasa moldeada, o puede montarse a partir de una colección de piezas (244) de carcasa de boquilla, tales como dos, tres, cuatro o más piezas de carcasa de boquilla. La Fig. 20 ilustra un conjunto (210) de boquilla que incluye dos piezas (244a), (244b) de carcasa de boquilla en forma de un tapón (228) de boquilla fijado a una base (230) de boquilla.

El sistema de citómetro de flujo puede incluir una fuente (326) envolvente acoplada de manera fluida al conjunto (210) de boquilla para proporcionar el fluido (328) envolvente al conjunto (210) de boquilla. Puede acoplarse también una fuente (320) de muestra al conjunto (210) de boquilla para proporcionar fluido (322) de muestra al conjunto (210) de boquilla. El fluido (322) de muestra y el fluido (328) envolvente pueden introducirse a una cavidad (214) de boquilla bajo presión y, a continuación, pueden pasarse a través de una punta (242) de boquilla que tiene un orificio (226) de salida de boquilla para formar un vapor (236) de fluido a lo largo de una trayectoria de flujo que tiene un eje (294) de flujo. El interior del conjunto (210) de boquilla puede estar configurado para producir una corriente (236) de fluido desde el orificio (226) de salida de boquilla en forma de una corriente coaxial que tiene una corriente de núcleo interior de fluido (322) de muestra rodeada por una corriente exterior de fluido (328) envolvente.

Un elemento (252) oscilante, tal como un cristal piezoeléctrico, puede estar situado en el interior del conjunto (210) de boquilla para perturbar la corriente (236) de fluido en gotitas (260) a cierta distancia por debajo del orificio (226) de salida de boquilla. Los elementos oscilantes anteriores se situaban o bien por encima de la cavidad de la boquilla o bien en el interior de la cavidad de la boquilla en la parte superior de la cavidad. Un aspecto del conjunto (210) de boquilla actual se refiere a un elemento (252) oscilante que se posiciona para rodear una parte de la cavidad (214) de la boquilla y que reduce la distancia entre el elemento (252) oscilante y el orificio (226) de salida de boquilla. El elemento (252) oscilante puede tener un anillo o una forma toroidal con un diámetro exterior y un diámetro interior y puede estar en comunicación con un controlador (258). El controlador (258) puede producir una señal de accionamiento, tal como entre aproximadamente 10 kHz y 120 kHz para perturbar la corriente (236) de fluido para que esté comprendida entre aproximadamente 20.000 gotitas por segundo y 120.000 gotitas por segundo. La frecuencia y la amplitud de la señal de accionamiento pueden ser manipuladas y/o ajustadas por un usuario mediante una interfaz gráfica de usuario o mediante hardware. Como un ejemplo, el elemento (252) oscilante puede estar situado aproximadamente en la mitad del conjunto (210) de boquilla que rodea la cavidad (214) de la boquilla. Esta ubicación puede estar en el interior de la carcasa (212) de boquilla, o fuera de la carcasa (212) de boquilla, pero acoplado mecánicamente a la carcasa. Independientemente de la ubicación interior o exterior, se cree que dicha colocación axial del elemento (252) oscilante produce gotitas de manera más eficiente. En esta configuración, las vibraciones mecánicas se transfieren a través del conjunto (210) de boquilla y a través del fluido (328) envolvente de una manera similar a la de un altavoz para producir una característica pulsante en la corriente (236) de fluido. Eventualmente, esta característica pulsante rompe la corriente (236) de fluido en gotitas (260) a cierta distancia por debajo del orificio (226) de salida de boquilla. Independientemente de otras características inventivas descritas en el presente documento, la presente solicitud contempla el beneficio de modificar la colocación de un elemento (252) oscilante en el interior de o acoplado a cualquier boquilla para una mayor eficiencia en la producción de gotitas.

Puede montarse un pasador (262) de carga con el conjunto (210) de boquilla. El pasador (262) de carga puede construirse a partir de cualquier material conductor de electricidad y proporciona una conexión eléctrica entre un elemento (252) de carga y el fluido (328) envolvente contenido en la cavidad (214) de la boquilla. A través del pasador (262) de carga puede impartirse una carga a toda la corriente (236) de fluido, que incluye la formación de una gotita justo antes de separarse de la corriente (236) de fluido. Un analizador (378) u otro dispositivo de procesamiento puede determinar las características físicas o químicas de las partículas en la muestra y puede clasificar las partículas en una o más subpoblaciones. En base a cualquier instrucción relacionada con la subpoblación en la que se clasifica una partícula y a otros parámetros de clasificación, incluyendo un retardo de gota calibrado, el analizador (378) indicará a un circuito (254) de carga que cargue la corriente (236) de fluido cargando el pasador (262) de carga justo antes de la formación de una gotita en la que se espera que se encuentre esa partícula. De esta manera, puede suministrarse a las gotitas (260) una carga específica, incluyendo una carga nula, en base a las características de las partículas contenidas en las mismas.

El conjunto (210) de boquilla puede incluir un asiento (302) de boquilla para acoplarse en su posición en el sistema de citómetro de flujo. Mientras las boquillas anteriores pueden haber sido aseguradas a etapas ajustables con elementos de sujeción (tales como tornillos, pernos, etc.), el conjunto (210) de boquilla puede incluir un asiento (302) de boquilla

construido sin elementos de sujeción. A modo de ejemplo, el asiento (302) de boquilla puede acoplarse a un citómetro de flujo sin la ayuda de elementos de sujeción.

Un láser (330), tal como una fuente de radiación electromagnética, puede dirigirse a una región conocida como zona (332) de inspección en la corriente (236) de fluido. Las partículas en el interior de la corriente de fluido pueden reflejar y/o emitir radiación electromagnética en respuesta a esta excitación, y esta radiación electromagnética reflejada y emitida puede ser detectada por uno o más detectores (334). Estos detectores (334) pueden producir señales representativas de la radiación (336) electromagnética emitida o reflejada, y esas señales pueden ser procesadas por un analizador o un sistema de detección para derivar una serie de propiedades químicas y físicas. A continuación, el analizador (378) puede proporcionar instrucciones al circuito (254) de carga con el fin de efectuar la acción de clasificación apropiada.

La Fig. 21 ilustra una vista en despiece del conjunto (210) de boquilla. Dicho conjunto (210) de boquilla. La vista en despiece ilustra un primer elemento (284a) de sujeción y un segundo elemento (284b) de sujeción para asegurar una primera pieza (244a) de boquilla, en forma de tapón (228) de boquilla, y una segunda pieza (244b) de boquilla, en forma de una base (230) de boquilla, a un asiento (302) de boquilla. Sin embargo, el conjunto (210) de boquilla puede construirse con cualquier número de elementos (284) de sujeción y piezas (244) de boquilla. En la realización ilustrada, el asiento (302) de boquilla incluye una primera parte (282a) roscada para recibir el primer elemento (284a) de sujeción y una segunda parte (282b) roscada para recibir el segundo elemento (284b) de sujeción. En otras realizaciones, los elementos de sujeción pueden combinarse con y/u omitirse en favor de adhesivos u otros medios de acoplamiento, tales como imanes o medios mecánicos, incluyendo muelles.

El tapón (228) de boquilla puede incluir una entrada (216) de muestra que está en comunicación de fluido con un vástago (232) de inyección y un tubo (218) de inyección para formar una trayectoria de flujo de fluido. El vástago (232) de inyección puede formarse de manera integral con el tapón (228) de boquilla, o puede formarse como una pieza de boquilla separada. El tubo (218) de inyección puede sobremoldearse o puede moldearse por inserción con el tapón (228) de boquilla de manera que proporcione una comunicación de fluido entre la entrada (216) de muestra y el tubo (218) de inyección. Esta técnica puede proporcionar un tubo (218) de inyección muy corto y situado de manera precisa. En una realización, puede acoplarse un dispositivo al vástago (232) que proporciona una superficie con una posición axial ajustable. Como ejemplo, el tubo (218) de inyección puede sobremoldearse sobre dicho elemento, que, a continuación, se acopla mecánicamente al vástago (232) de inyección. En una realización, el tubo (218) de inyección se forma a partir de un material rígido liso para garantizar las propiedades de flujo de fluido deseadas. En una realización alternativa, el tubo de inyección se forma a partir de un material más flexible, que puede manipularse después de la formación o el moldeo del tubo de inyección. Por ejemplo, el tubo de inyección puede manipularse para cambiar la geometría inicial de una trayectoria de fluido formada en el mismo con el propósito de estimular una corriente de núcleo con forma de cinta. Como un ejemplo no limitativo, pueden incorporarse modificaciones a la geometría mediante grabado con láser de ciertas partes o mediante una etapa de fabricación que consiste en apretar el tubo de inyección mientras se encuentra en un estado flexible y no perfectamente elástico. Pueden incorporarse también otras técnicas de fabricación para conformar la salida del tubo de inyección, de manera que un eje sea más largo que un segundo eje. Sólo como un ejemplo ilustrativo, pueden emplearse otras técnicas de fabricación que resulten en una salida elíptica o rectangular del tubo de inyección.

La segunda pieza (244b) de boquilla, en forma de una base (230) de boquilla, puede dimensionarse para acoplarse con la tapa (228) de boquilla. Un elemento (252) oscilante puede moldearse por inserción con la base (230) de boquilla, o puede encapsularse en una cavidad en la base (230) de boquilla. En una realización, la base (230) de boquilla está dimensionada para recibir una punta (242) de boquilla. Por ejemplo, la base (230) de boquilla puede incluir dimensiones internas para acoplarse con la punta (242) de boquilla, mientras que el exterior de la base de la boquilla puede estar roscado para recibir una tuerca (292) de retención que sujeta la punta (242) de boquilla en su sitio. En otra realización, la punta (242) de boquilla puede moldearse por inserción con la base (230) de boquilla y, en todavía otra realización, la punta de la boquilla puede moldearse como una parte de la base (230) de boquilla.

El asiento (302) de boquilla puede adoptar la forma de una abrazadera (278) de boquilla que recibe el primer elemento (284a) de sujeción y el segundo elemento (284b) de sujeción de una manera que sujeta el tapón (228) de boquilla a la base (230) de boquilla. El asiento (302) de boquilla puede dimensionarse para un acoplamiento sin elementos de sujeción al receptor (350). Como un ejemplo, el asiento (302) de boquilla puede comprender un material metálico acoplado a un receptor (350) que tiene propiedades magnéticas. Puede situarse un material magnético en uno cualquiera o en ambos de entre el asiento (302) de boquilla y el receptor (350). En una realización similar, uno o ambos de estos componentes pueden construirse de manera que incluyan electroimanes o materiales que demuestren propiedades magnéticas en respuesta a una corriente eléctrica. En esta configuración, un conjunto (210) de boquilla puede simplemente dejarse caer a su sitio y puede ser mantenido por la gravedad y el acoplamiento de los componentes magnéticos. Dichas boquillas son intercambiables rápida y fácilmente. En muchos entornos, el tiempo de inactividad del citómetro de flujo resulta en una pérdida de tiempo de producción y el asiento (302) de boquilla, tal como se describe en el presente documento, proporciona un método extremadamente eficiente para reemplazar las boquillas

y puede mejorar la productividad de un sistema de citómetro de flujo determinado. El asiento (302) de boquilla y el receptor (350) pueden construirse en una diversidad de otras configuraciones para acoplar la boquilla a un citómetro de flujo sin elementos de sujeción. En una realización, el asiento (302) de boquilla, o el receptor (350), puede incluir muelles para asegurar las dos piezas en un acoplamiento sin elementos de sujeción. Por ejemplo, una bola empujada por muelle en un componente puede estar diseñada para bloquearse en un receptáculo en el otro componente. El asiento (302) de boquilla puede estar dimensionado también físicamente para una configuración de enclavamiento con un asiento en una etapa ajustable en el cabezal del citómetro de flujo. En dicha realización, el asiento (302) de boquilla puede estar dimensionado para ser recibido por una etapa ajustable. Una vez en su sitio, el asiento (302) de boquilla puede asegurarse por rotación para conseguir un conjunto de enclavamiento, o mediante otros medios mecánicos, tales como medios mecánicos provistos en la etapa ajustable.

El asiento (302) de boquilla puede incluir un elemento (354) de alineación en forma de una protuberancia que generalmente se extiende más allá del límite restante de la superficie inferior del asiento (302) de boquilla. El receptor (350) puede incluir una muesca (352) de alineación. El elemento (354) de alineación y la muesca (352) de alineación pueden estar dimensionados para favorecer un acoplamiento en una orientación especificada. En otras realizaciones, puede haber múltiples muescas (352) de alineación para potencialmente asegurar un único elemento (354) de alineación. En esta configuración, el conjunto (210) de boquilla puede encontrarse en una de entre múltiples orientaciones predefinidas con relación al sistema de citómetro de flujo. En otra realización, el receptor (350) es ajustable y puede asegurarse en múltiples posiciones para modificar la orientación proporcionada mediante la alineación del elemento (354) de alineación y la muesca (352) de alineación. En una realización, una bola empujada por muelle puede servir como un medio para acoplar el asiento (302) de boquilla con el receptor (305) y como elemento (354) de alineación para alinear los dos componentes. Aunque no se han ilustrado componentes adicionales del citómetro de flujo, debe entenderse que el receptor (350) puede estar fijado firmemente a una etapa, tal como una etapa que es ajustable en dos o tres dimensiones con propósitos de alineación.

El elemento (354) de alineación y la muesca (352) de alineación, además de proporcionar una orientación específica, pueden proporcionar una ubicación precisa de la boquilla, lo que permite un reemplazo rápido de un conjunto de boquilla y minimiza la necesidad de volver a alinear el citómetro de flujo. En combinación con el acoplamiento magnético, esta configuración puede eliminar las fuerzas que tienden a desalinear la boquilla con relación a los detectores o la fuente de radiación electromagnética. Específicamente, puede aplicarse un par de torsión a la plataforma ajustable en la que se asienta la boquilla cuando los elementos de sujeción se aseguran en su sitio mediante una fuerza hacia abajo que un operador aplica a los propios elementos de sujeción.

Pueden usar también muescas, ranuras, y otras superficies y geometrías complementarias, individualmente o en combinación con un acoplamiento magnético, para proporcionar configuraciones adicionales que permitan un acoplamiento rápido y preciso con una orientación y/o una ubicación preferidas. En otra realización, pueden aplicarse ayudas visuales a la boquilla en forma de marcas o muescas para facilitar un reemplazo rápido y fácil de las boquillas.

Tal como puede entenderse a partir de lo anterior, pueden incorporarse diversas características del conjunto de boquilla a un citómetro de flujo, así como a un método para la fabricación de un citómetro de flujo.

Tal como puede entenderse a partir de lo anterior, los conceptos básicos de la presente invención pueden materializarse de diversas maneras. De esta manera, las realizaciones o los elementos particulares de la invención divulgados en la descripción o mostrados en las figuras que acompañan a la presente solicitud no pretenden ser limitativos, sino más bien ejemplos de las numerosas y variadas realizaciones abarcadas genéricamente por la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Sistema (10) de citómetro de flujo que comprende:

un conjunto (14, 210) de boquilla para producir una corriente (16, 236) de fluido con partículas, comprendiendo el conjunto de boquilla una punta (45, 46, 242) de boquilla que comprende:

- 5 i) un cuerpo (80) cilíndrico que define un eje (82) longitudinal; y
  - ii) un cuerpo (84) troncocónico adyacente al cuerpo cilíndrico en el eje longitudinal y en comunicación de fluido con el cuerpo cilíndrico, en el que el cuerpo troncocónico termina en una superficie (62) plana transversal al eje longitudinal que tiene un orificio (44, 226) de salida de boquilla; y
- 10 en el que el cuerpo troncocónico comprende además un chaflán (90) en el borde de la superficie plana y el cuerpo troncocónico, definiendo dicho chaflán una parte proximal del cuerpo troncocónico, de manera que dicha parte proximal tenga un primer ángulo de ahusamiento con respecto a dicha superficie plana comprendido entre 15 y 60 grados y en el que la parte distal del cuerpo troncocónico tiene un segundo ángulo de ahusamiento, y en el que el segundo ángulo de ahusamiento es mayor que el primer ángulo de ahusamiento;
- 15 un láser (34) para producir un haz (54) que incide sobre la corriente de fluido y las partículas, en el que el foco del haz láser en la corriente de fluido se coloca a una distancia de 300 micrómetros desde el orificio de salida; y
- un detector (32) para detectar la luz emitida o reflejada desde las partículas en el interior de la corriente de fluido en respuesta al haz.
2. Sistema de citómetro de flujo según la reivindicación 1, en el que el cuerpo de la punta de boquilla comprende una superficie interior y una superficie exterior.
- 20 3. Sistema de citómetro de flujo según la reivindicación 2, en el que la punta de boquilla comprende una punta de boquilla de orientación.
4. Sistema de citómetro de flujo según la reivindicación 3, en el que la superficie interior de la punta de boquilla comprende una geometría de orientación.
- 25 5. Sistema de citómetro de flujo según la reivindicación 4, en el que la superficie interior de la punta de boquilla achaflanada realiza una transición desde una sección transversal circular a una sección transversal elíptica y, a continuación, a un orificio de salida circular.
6. Sistema de citómetro de flujo según la reivindicación 1, que comprende además una muesca (120, 352) formada en el cuerpo cilíndrico para posicionar la punta de boquilla en el interior del conjunto de boquilla del citómetro de flujo.
- 30 7. Sistema de citómetro de flujo según la reivindicación 1, en el que el primer ángulo de ahusamiento es aproximadamente igual que el ángulo vertical esperado de las emisiones producidas por las partículas en la corriente de fluido en respuesta al haz.
8. Sistema de citómetro de flujo según la reivindicación 1, en el que el primer ángulo de ahusamiento en la punta de boquilla achaflanada es de aproximadamente 30 grados.
- 35

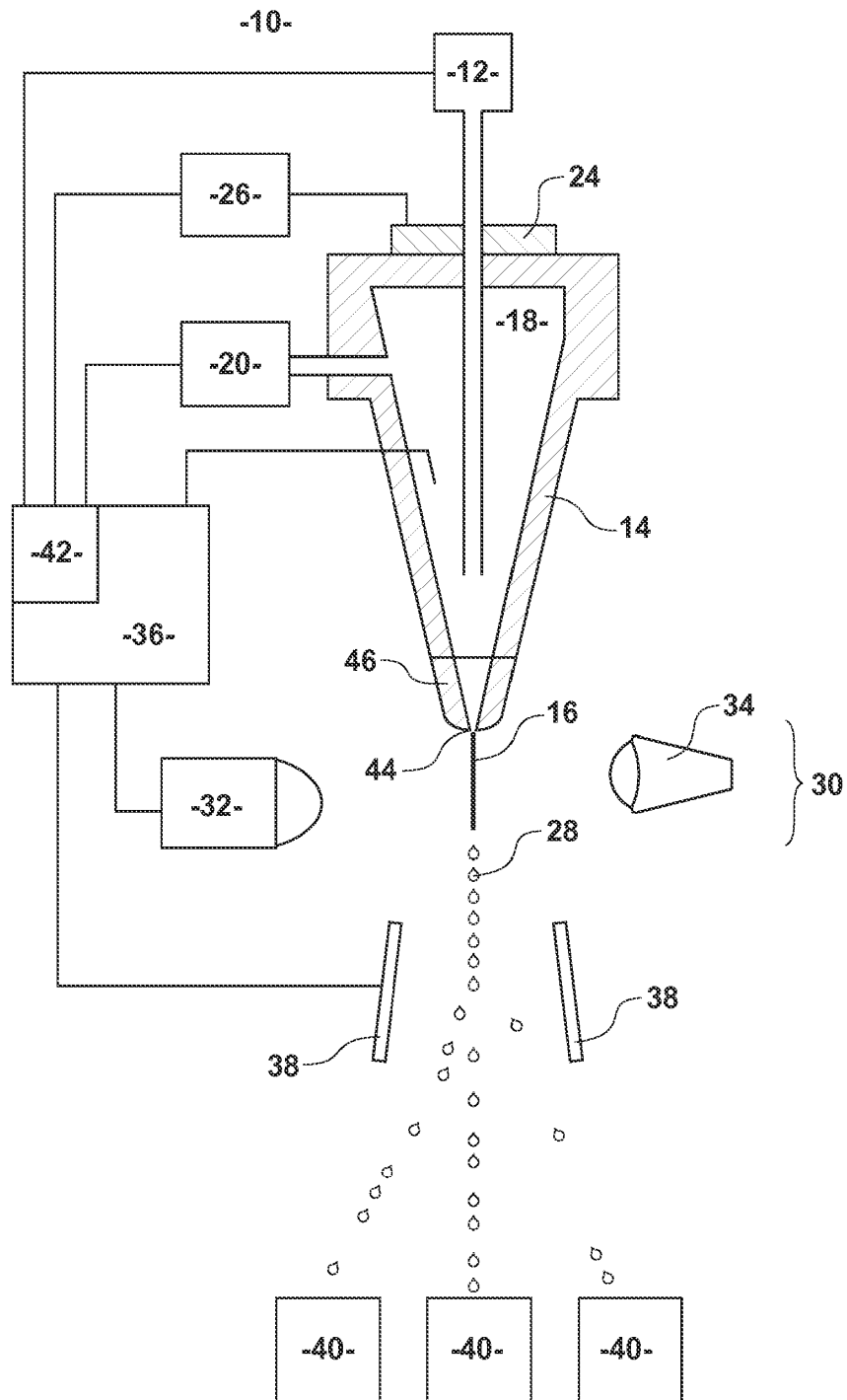


FIG. 1

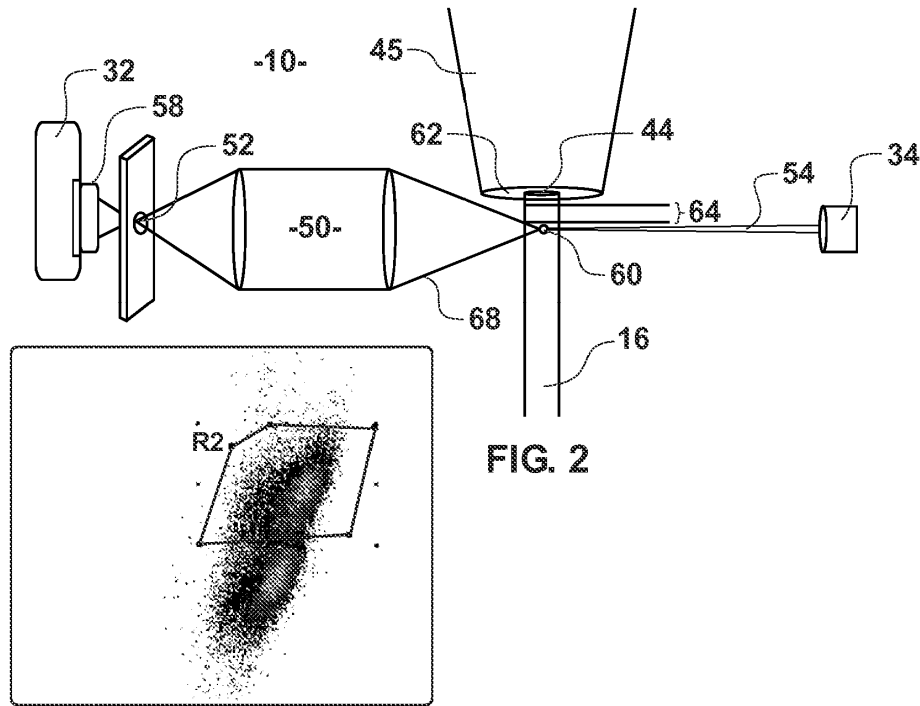


FIG. 3

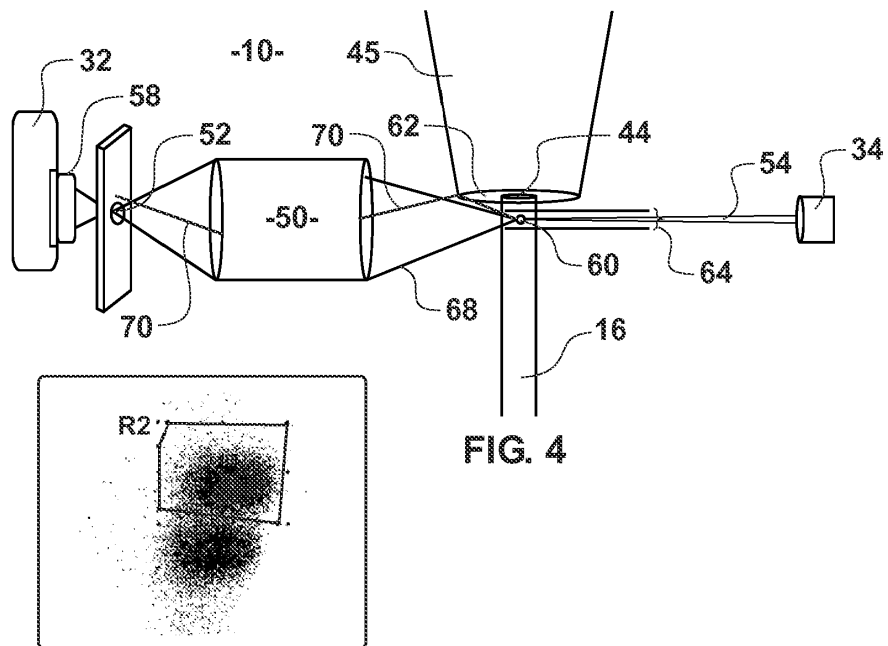
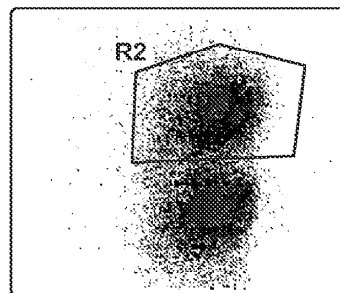
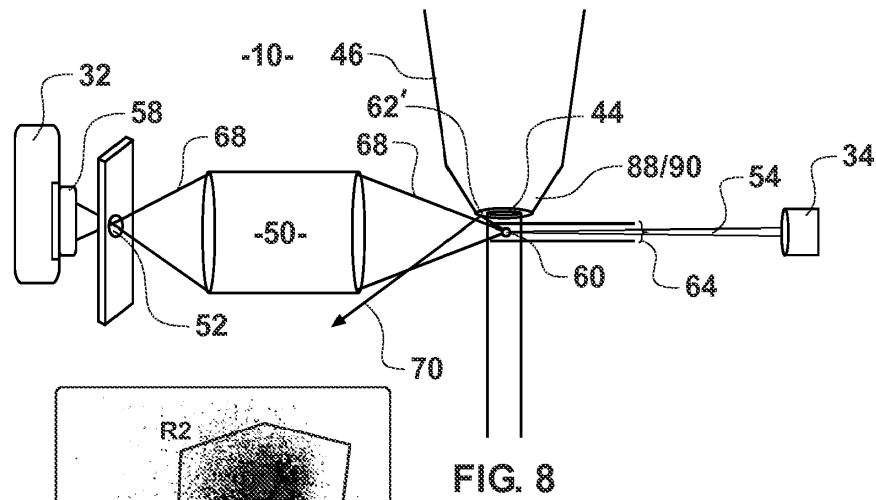
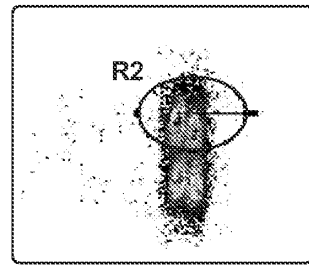
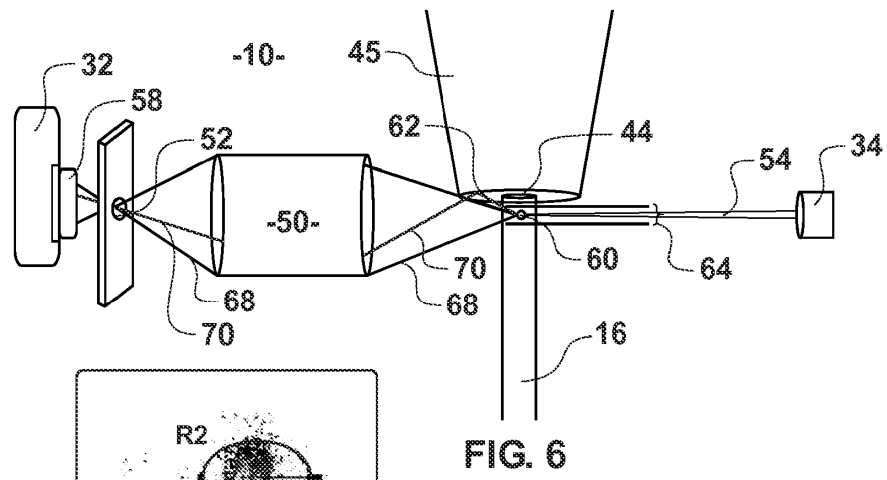
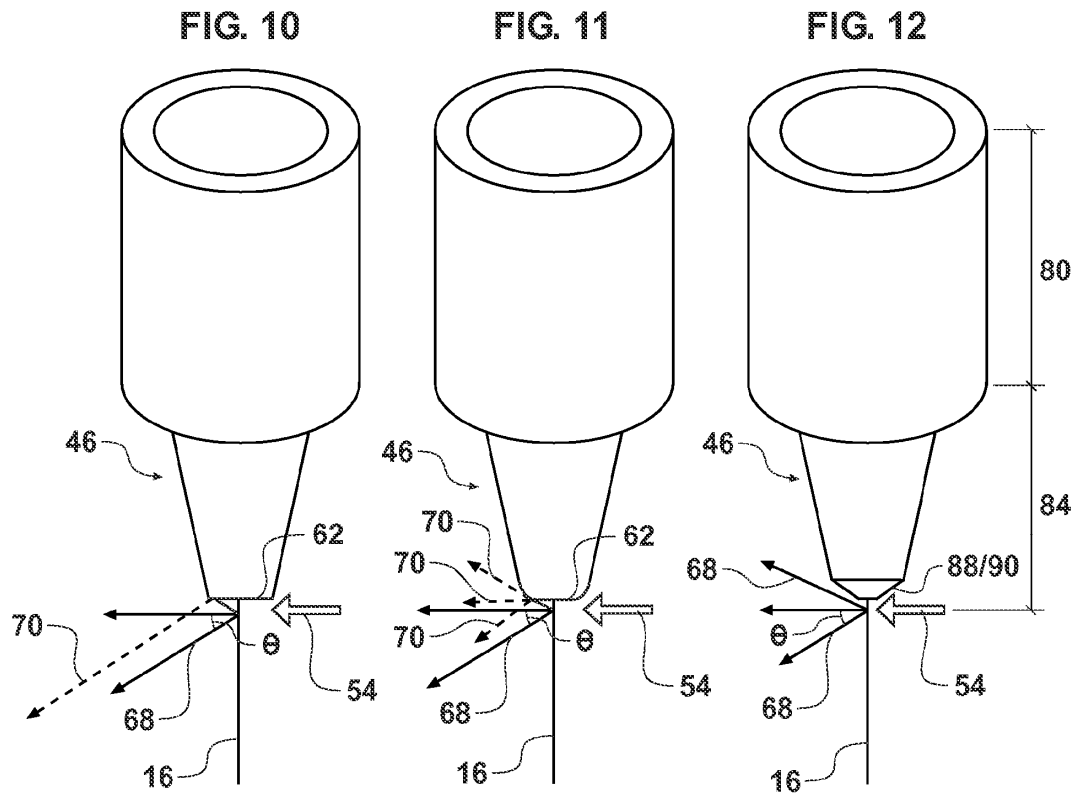


FIG. 4

FIG. 5







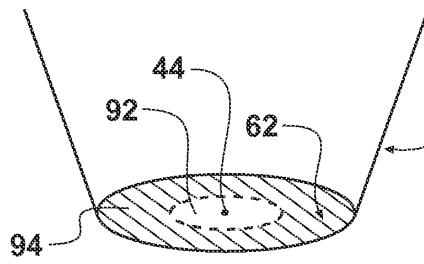


FIG. 13

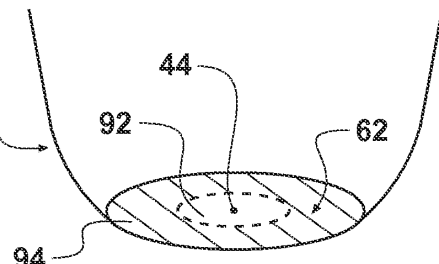


FIG. 14

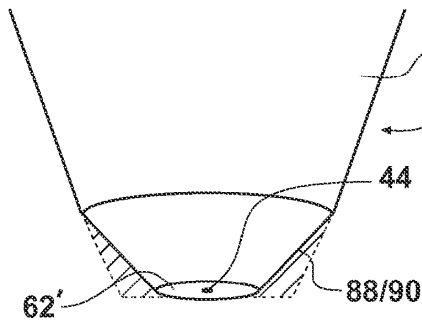


FIG. 15

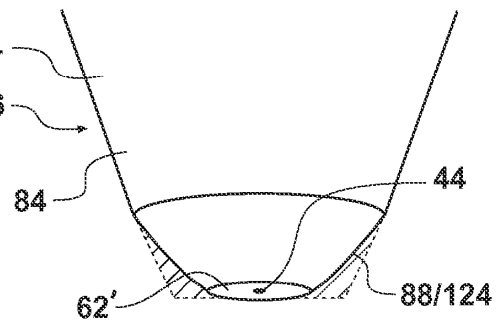


FIG. 16

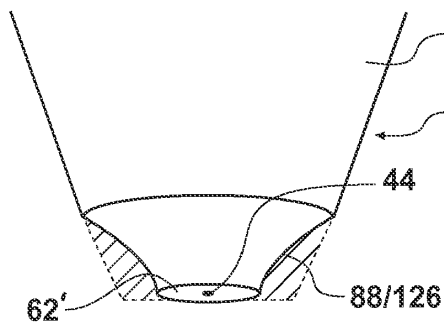


FIG. 17

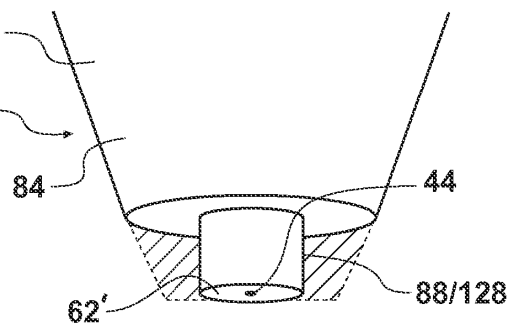


FIG. 18

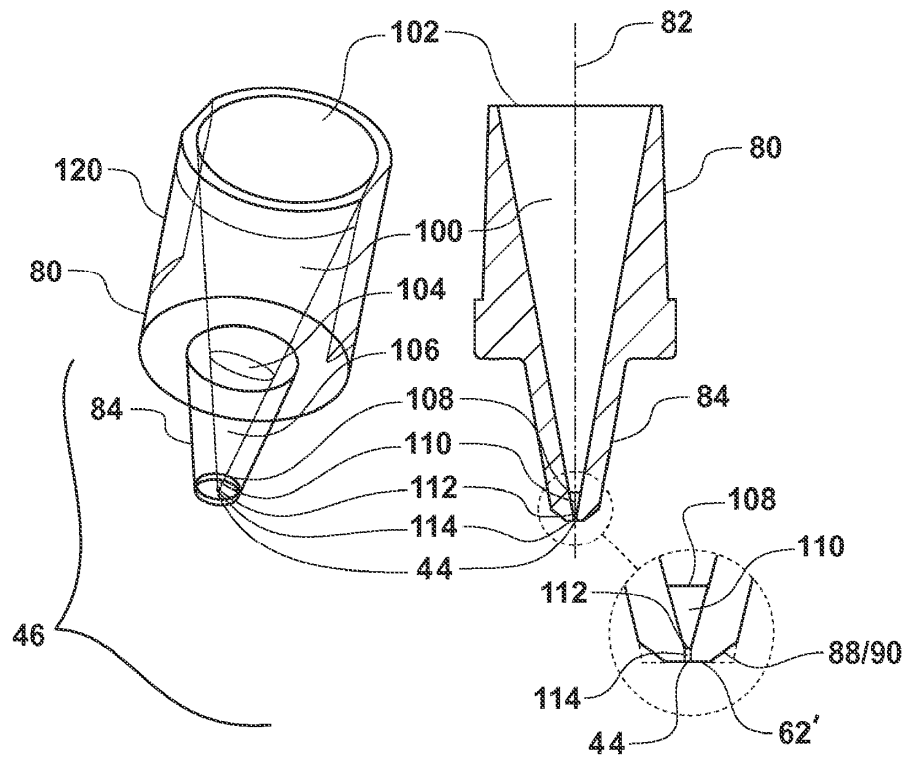


FIG. 19

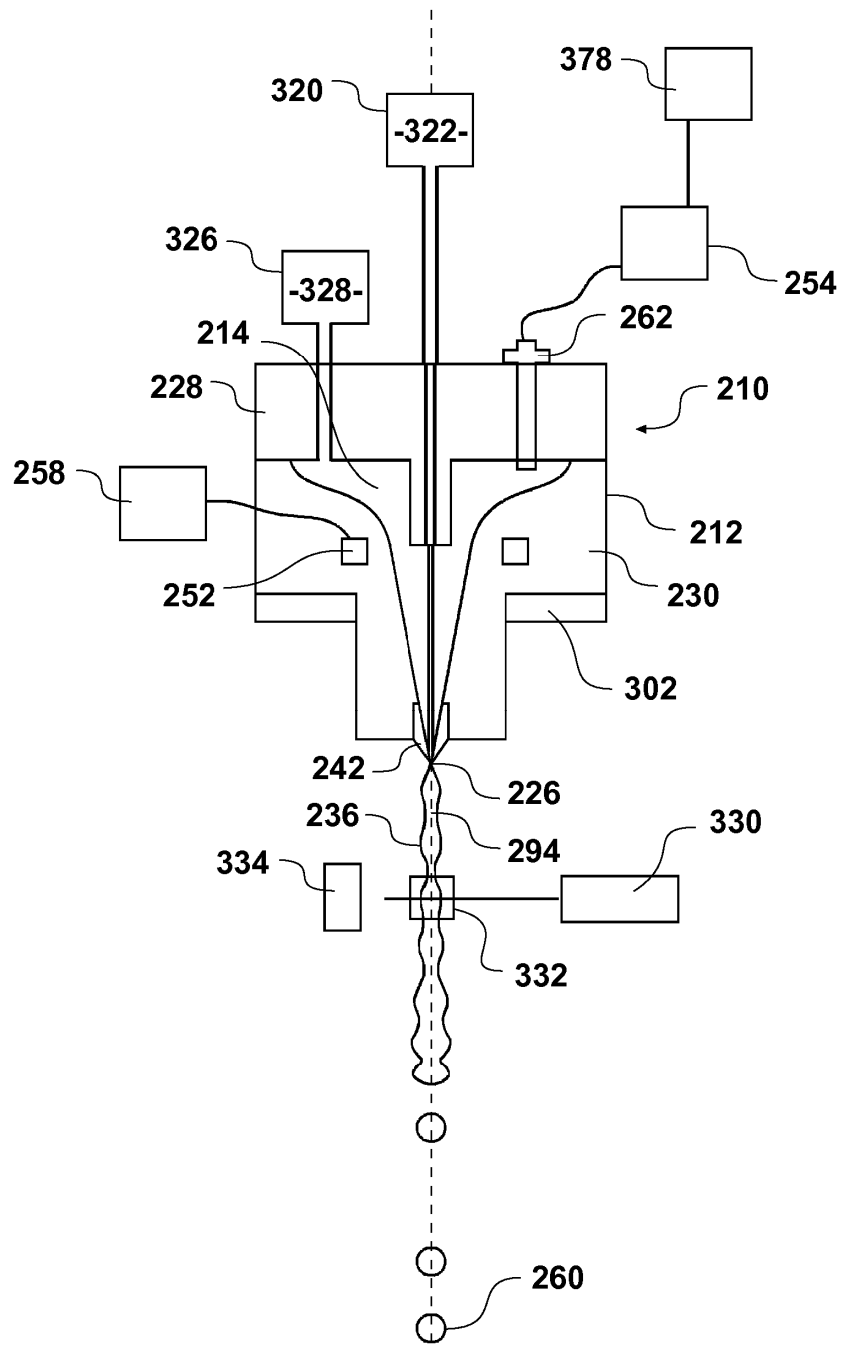
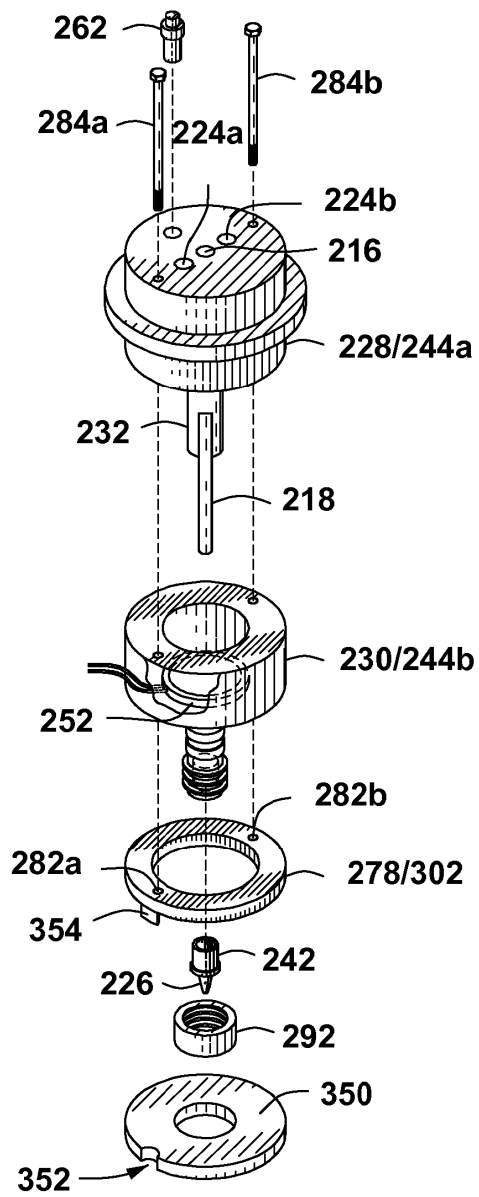


FIG. 20

210



**FIG. 21**