

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 963 359**

51 Int. Cl.:

G01N 21/85 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2014** **PCT/US2014/035194**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014** **WO14176366**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2014** **E 14788653 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2023** **EP 2989457**

54 Título: **Métodos y sistemas para la recogida de luz utilizando reflexión interna total**

30 Prioridad:

26.04.2013 US 201361816288 P

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

26.03.2024

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive, Mail Code 110
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

72 Inventor/es:

VAN DER ENGH, GERRIT J y
PETERSEN, TIMOTHY, WAYNE

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 963 359 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

Métodos y sistemas para la recogida de luz utilizando reflexión interna total

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud está relacionada con la solicitud de patente provisional de Estados Unidos con núm. de serie US-61/816.288, presentada el 26 de abril de 2013.

10 Introducción

La citometría de flujo es una técnica utilizada para caracterizar y/o clasificar material biológico en base a propiedades tales como marcadores de la superficie celular, el ADN u otro contenido celular. La técnica puede utilizarse para registrar distribuciones y/o clasificar el material biológico. Los materiales biológicos de interés se encuentran normalmente presentes en una solución de base acuosa, tal como en la detección de flujo envolvente en experimentos de electroforesis, y pueden incluir marcadores detectables, tales como los colorantes fluorescentes. En la citometría de flujo, el experimentador dirige uno o más haces de luz al material biológico en el canal acuoso, y observa la luz dispersada y emitida desde la muestra. Las variaciones en los materiales, tales como la morfología o el marcador fluorescente, pueden causar variaciones de la luz observada, y estas variaciones permiten la caracterización y categorización deseadas. Para cuantificar estas variaciones, se debe recoger la luz. Es deseable recoger tanta la luz como sea posible, con el fin de maximizar la velocidad y sensibilidad del procedimiento.

En los citómetros de flujo utilizados previamente, la luz dispersada de ángulo recto se ha visto perpendicularmente al flujo de líquido, normalmente usando una lente objetivo de microscopio de alta apertura numérica (NA) o fibra óptica. Los objetivos de microscopios de la máxima calidad tienen una "apertura numérica" de 0,6, lo que proporciona un ángulo polar subtendido de $2\theta=37^\circ$ (0,64 radianes). Algunas de las dificultades asociadas con este enfoque incluyen la profundidad de campo muy limitada de las lentes de alta NA, y la necesidad de alinear exactamente el punto focal exacto de la lente con la región irradiada del canal de flujo. Otros métodos incluyen la recogida de luz desde dentro del canal de flujo. Estos métodos pueden alterar el flujo de muestra y/o contaminar una muestra. Son de interés los métodos y sistemas que proporcionan una mejor recogida de luz desde un canal de flujo, y que maximizan la recogida de luz a la vez que minimizan la interrupción del canal de flujo.

Según su resumen, el documento US-5.671.046A, declara "El dispositivo y método se describen para detectar ópticamente partículas en una corriente de líquido libre (es decir, no encerrada). La corriente de líquido libre se produce expulsando líquido a presión desde una boquilla, de manera que la corriente tenga una superficie redonda y lisa. Un haz de láser intersecta la corriente de líquido libre, y la luz dispersada por las partículas en la corriente de líquido libre se recoge y procesa para proporcionar una salida indicativa del tamaño y/o número de partículas que hacen que la luz se disperse. La corriente de líquido libre se dirige preferiblemente verticalmente hacia abajo, y el haz de láser y el colector de luz se colocan angularmente con respecto a la corriente de líquido libre y entre sí con el colector de luz que recoge la luz dispersada en la intersección del haz de luz y la corriente de líquido libre. También se describen realizaciones en donde la luz dispersada se recoge en una posición de recogida separada a lo largo de la corriente de líquido libre desde una posición de iluminación donde el haz de láser intersecte la corriente de líquido libre con la luz dispersada que se desplaza a lo largo de la corriente libre de líquido entre las posiciones de iluminación y de recogida".

Según su resumen, el documento US-4.226.532A, declara "Según la invención, el dispositivo para el análisis granulométrico de partículas contenidas en fluidos comprende un canal de alimentación y un canal receptor destinados al paso de un fluido bajo investigación. Los dos canales se comunican entre sí a través de una boquilla. La relación entre los diámetros de la boquilla y el canal receptor está en el intervalo de 1/4 a 1/7. El canal receptor está provisto de ventanas transparentes para el paso de un flujo de luz emitido por un medio de iluminación a través del fluido en ese canal. El dispositivo incluye, además, un medio sensible a la luz para recibir luz reflejada desde las partículas contenidas en el fluido".

Sumario

La presente descripción incluye una boquilla de celda de flujo configurada para propagar una corriente de flujo que comprende una muestra en donde la boquilla de celda de flujo comprende: una cámara de boquilla que tiene un extremo proximal y un extremo distal; y un orificio de boquilla colocado en el extremo distal de la cámara de boquilla, en donde la cámara de boquilla comprende paredes, que comprenden un recubrimiento reflectante, que están en ángulo de 120° a 160° con respecto al eje longitudinal de la corriente de flujo, cuando la corriente de flujo sale del orificio de boquilla y refleja la luz emitida por la muestra que se propaga corriente arriba por la reflexión interna total a través de la corriente de flujo, cuando la corriente de flujo sale del orificio de boquilla al extremo proximal de la cámara de boquilla.

La cámara de boquilla comprende preferiblemente una parte cilíndrica proximal.

La anchura de las paredes de la celda de flujo en el orificio de boquilla es preferiblemente un cuarto o menos de la anchura de la corriente de flujo.

La cámara de boquilla puede comprender, además, un componente de ajuste óptico

La presente descripción también incluye un sistema para detectar luz propagada en una corriente de flujo mediante reflexión interna total, comprendiendo el sistema:

5 una fuente de luz configurada para irradiar una muestra en la corriente de flujo en un campo de interrogación; una boquilla de celda de flujo como se mencionó anteriormente, y un detector para medir una o más longitudes de onda de luz propagada por la muestra en el extremo proximal de la cámara de boquilla.

10 La fuente de luz es preferiblemente un láser.

La boquilla de celda de flujo se coloca preferiblemente ortogonal a la fuente de luz.

15 La descripción también incluye un método para detectar luz propagada en una corriente de flujo mediante reflexión interna total, comprendiendo el método:

irradiar una muestra en la corriente de flujo en un campo de interrogación con una fuente de luz;

20 propagar la corriente de flujo con una boquilla de celda de flujo como se describió anteriormente,

detectar la luz emitida por la muestra en la corriente de flujo propagada corriente arriba a través de la corriente de flujo mediante reflexión interna total en un extremo proximal de la cámara de boquilla, y medir la luz detectada en una o más longitudes de onda.

25 La corriente de flujo se irradia preferiblemente en un campo de interrogación que es ortogonal, y se coloca a 1 mm o más corriente abajo del orificio de boquilla de celda de flujo.

La muestra puede emitir fluorescencia heterogéneamente.

30 La muestra es preferiblemente un gameto.

Breve descripción de las figuras

35 La invención puede entenderse mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con los dibujos adjuntos. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras:

La **Figura 1A** representa una ilustración desde una vista superior de una celda de flujo del citómetro de flujo según determinadas realizaciones.

40 La **Figura 1B** representa una ilustración desde una vista lateral de una celda de flujo del citómetro de flujo según determinadas realizaciones.

La **Figura 2A** representa la colocación de un detector con respecto a la boquilla de celda de flujo según determinadas realizaciones.

45 La **Figura 2B** representa la colocación de un detector con la boquilla de celda de flujo según determinadas realizaciones.

Descripción detallada

50 Antes de que la presente invención se describa con mayor detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a realizaciones particulares descritas, ya que tales pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria tiene por objeto describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención se limitará únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

55 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado, está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están abarcados dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluya uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

65 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria también se puede usar en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos representativos.

La cita de cualquier publicación es para su descripción anterior a la fecha de presentación, y no debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

Como se resume anteriormente, la presente descripción proporciona una celda de flujo configurada para propagar la luz corriente arriba emitida por una muestra en una corriente de flujo por reflexión interna total. En la descripción adicional de las realizaciones de la descripción, las celdas de flujo configuradas para propagar la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo por reflexión interna total se describen primero con mayor detalle. A continuación, se describen sistemas para medir la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo. También se proporcionan métodos para analizar una muestra.

Boquillas de celda de flujo para propagar la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo

Como se resumió anteriormente, los aspectos de la presente descripción incluyen celdas de flujo configuradas para propagar la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo corriente arriba con reflexión interna total. El término “propagar” se usa en la presente memoria en su sentido convencional para referirse al recorrido de la luz a través del medio fluido de la corriente de flujo donde la trayectoria de luz propagada es una función de la refracción, reflexión, difracción e interferencia por el medio fluido. Como se describe con mayor detalle a continuación, la luz emitida por una muestra en la corriente de flujo se propaga corriente arriba por reflexión interna total. Por “corriente arriba” se entiende que la luz emitida se propaga y se recoge en una dirección que es opuesta a la dirección del flujo de fluido por la corriente de flujo. En otras palabras, cuando la boquilla de celda de flujo se coloca para generar una corriente de flujo que atraviesa la dirección Y positiva a lo largo del eje Y en un plano X-Y, las boquillas de celda de flujo de las realizaciones de la invención se configuran para propagar la luz en la dirección Y negativa. Asimismo, cuando la boquilla de celda de flujo se coloca para generar una corriente de flujo que atraviesa la dirección X positiva a lo largo del eje X en un plano X-Y, las boquillas de celda de flujo se configuran para propagar la luz en la dirección X negativa.

La frase “reflexión interna total” se usa en la presente memoria en su sentido convencional para referirse a la propagación de ondas electromagnéticas dentro de los límites de un medio fluido, de manera que cuando una ola de propagación golpee el límite del medio en un ángulo mayor que el ángulo crítico con respecto a la normal a la superficie, la onda electromagnética se refleja internamente. En particular, cuando el índice de refracción es menor en el otro lado del límite del medio fluido y el ángulo incidente es mayor que el ángulo crítico, la onda de luz que se propaga no pasa a través del límite y se refleja internamente. La luz emitida por una muestra en una corriente de flujo emite luz en todas las direcciones en un medio fluido. No todas las señales de luz pueden observarse desde fuera del canal de flujo. Una fracción significativa de la luz permanece dentro de la columna cilíndrica de la corriente de flujo de manera que la corriente de flujo actúa como una guía de onda. Los rayos de luz que se acercan a la interfaz medio fluido/aire con un ángulo que excede un ángulo crítico (es decir, el ángulo de reflexión interna total [TIR]) se reflejan de vuelta al medio. Por ejemplo, el ángulo de TIR de la interfaz agua/aire es $\arcsin(1/1,33) = 48,7^\circ$. En consecuencia, dos conos de luz a lo largo del eje del canal de flujo, uno encima y uno debajo de la partícula emisora de luz, quedan atrapados dentro de la corriente de flujo del citómetro de flujo. Para una partícula fluorescente isotrópica, la luz atrapada dentro de cada uno de los conos representa $2\pi(1 - \cos(90 - 48,7)) / 4\pi$, o 0,1244 de la emisión de fluorescencia total.

En realizaciones de la presente descripción, las boquillas de celda de flujo se configuran para propagar la luz emitida por una muestra en la corriente de flujo en una dirección corriente arriba por reflexión interna total. En otras palabras, las boquillas de celda de flujo objeto se configuran para dirigir la luz propagada dentro de la corriente de flujo de vuelta a la boquilla de celda de flujo a través del orificio de boquilla, y la luz medida por el detector es la luz que se refleja internamente dentro de la corriente de flujo. En realizaciones, las boquillas de celda de flujo objeto se configuran para propagar corriente arriba el 5 % o más de la luz emitida por la muestra en la corriente de flujo a través del orificio de boquilla por reflexión interna total, tal como el 10 % o más, tal como el 15 % o más, tal como en el 25 % o más, tal como en el 35 % o más, tal como en el 50 % o más, tal como en el 65 % o más, tal como en el 75 % o más, tal como en el 85 % o más, tal como en el 95 % o más, tal como en el 99 % o más, e incluyendo propagar corriente arriba el 99 % o más de la luz emitida por la muestra en la corriente de flujo a través del orificio de boquilla por reflexión interna total. Por ejemplo, las boquillas de celda de flujo de interés pueden configurarse para propagarse corriente arriba del 5 % al 95 % de la luz emitida por la muestra en la corriente de flujo, tal como del 10 % al 90 %, tal como del 15 % al 85 %, tal como del 20 % al 80 %, tal como del 25 % y el 75 %, e incluyendo del 30 % al 70 % de la luz emitida por la muestra.

En realizaciones de la presente descripción, la boquilla de celda de flujo incluye una cámara de boquilla que tiene un extremo proximal donde se recoge la luz propagada corriente arriba, y un extremo distal que tiene un orificio de boquilla en comunicación fluida con la corriente de flujo. En algunos casos, la boquilla de celda de flujo incluye una parte cilíndrica proximal que define un eje longitudinal, y una parte frustocónica distal que termina en una superficie plana que tiene el orificio de boquilla que es transversal al eje longitudinal. La longitud de la parte cilíndrica proximal (medida a lo largo del eje longitudinal) puede variar en el intervalo de 1 mm a 15 mm, tal como de 1,5 mm a 12,5 mm, tal como de 2 mm a 10 mm, tal como de 3 mm a 9 mm, e incluyendo de 4 mm a 8 mm. La longitud de la parte frustocónica distal (medida a lo largo del eje longitudinal) también puede variar, variando de 1 mm a 10 mm, tal como de 2 mm a 9 mm, tal como de 3 mm a 8 mm, e

incluyendo de 4 mm a 7 mm. El diámetro de la cámara de boquilla de celda de flujo puede variar, en algunas realizaciones, variando de 1 mm a 10 mm, tal como de 2 mm a 9 mm, tal como de 3 mm a 8 mm, e incluyendo de 4 mm a 7 mm.

En ciertos casos, la cámara de boquilla no incluye una parte cilíndrica, y toda la cámara de boquilla de la celda de flujo tiene forma frustocónica. En estas realizaciones, la longitud de la cámara de boquilla frustocónica (medida a lo largo del eje longitudinal transversal al orificio de boquilla) puede variar de 1 mm a 15 mm, tal como de 1,5 mm a 12,5 mm, tal como de 2 mm a 10 mm, tal como de 3 mm a 9 mm, e incluyendo de 4 mm a 8 mm. El diámetro de la parte proximal de la cámara de boquilla frustocónica puede variar de 1 mm a 10 mm, tal como de 2 mm a 9 mm, tal como de 3 mm a 8 mm, e incluyendo de 4 mm a 7 mm.

Dependiendo de las características de la corriente de flujo y del protocolo para detectar luz (descrito a continuación), el ángulo de las paredes frustocónicas de la boquilla de flujo con respecto al eje longitudinal de la corriente de flujo puede variar, en ciertas realizaciones, variando de 120° a 160°, tal como en un ángulo que varía de entre 125° y 155°, tal como de entre 130° y 150°, e incluyendo un ángulo que varía de entre 135° y 145°. En algunas realizaciones, las paredes frustocónicas de la cámara de boquilla forman un ángulo de 140° con respecto al eje longitudinal de la corriente de flujo. En otras realizaciones, las paredes de la cámara de boquilla forman un ángulo de 130° con respecto al eje longitudinal de la corriente de flujo. En ciertas realizaciones, las paredes de la cámara de boquilla forman un ángulo de 135° con respecto al eje longitudinal de la corriente de flujo.

En algunas realizaciones, las paredes de la cámara de boquilla son reflectantes. El término “reflectante” se usa en la presente memoria en su sentido convencional para referirse a la capacidad de las paredes de la cámara de boquilla para cambiar la dirección de una onda electromagnética (p. ej., por reflexión especular). Toda o parte de las paredes pueden ser reflectantes. Por ejemplo, el 10 % o más de las paredes de la cámara de boquilla pueden ser reflectantes, tal como el 25 % o más, tal como el 50 % o más, tal como el 75 % o más, tal como el 90 % o más, e incluyendo el 95 % o más de las paredes de la cámara de boquilla pueden ser reflectantes. En determinadas realizaciones, todas las paredes de la cámara de boquilla son reflectantes.

Dependiendo del recubrimiento reflectante asociado con (p. ej., aplicado a) las paredes de la cámara de boquilla (como se describe a continuación), las paredes de la cámara de boquilla pueden ser reflectantes hasta un intervalo de longitudes de onda, según se desee, tal como de 200 nm a 1500 nm, tal como de 250 nm a 1250 nm, tal como de 300 nm a 1000 nm, tal como de 350 nm a 900 nm, e incluyendo de 400 nm a 800 nm. En un ejemplo, las paredes de la cámara de boquilla de celda de flujo son reflectantes a la luz ultravioleta, la luz visible, y la luz cercana a infrarroja. En otro ejemplo, las paredes de la cámara de boquilla de celda de flujo son reflectantes a la luz ultravioleta y a la visible. En otro ejemplo más, las paredes de la cámara de boquilla de celda de flujo son reflectantes a la luz visible. En otro ejemplo más, las paredes de la cámara de boquilla de celda de flujo son reflectantes a la luz ultravioleta. En otro ejemplo más, las paredes de la cámara de boquilla de celda de flujo son reflectantes a la luz infrarroja.

Dependiendo de la reflectividad deseada de las paredes de la cámara de boquilla, el recubrimiento reflector óptico aplicado a las paredes de la cámara de boquilla puede variar. En algunas realizaciones, las paredes de la cámara de boquilla incluyen una o más capas de un recubrimiento de alta reflectividad, tales como dos o más capas, tales como tres o más capas, tales como cuatro o más capas, e incluyendo cinco o más capas del recubrimiento de alta resistencia. El recubrimiento de alta reflectividad puede ser un recubrimiento metálico de capa fina, tal como, pero sin limitarse a: oro, plata, aluminio, cromo, níquel, platino, Inconel y cualquier combinación de los mismos. Dependiendo del espectro de reflectividad deseado, el espesor del recubrimiento de alta reflectividad puede variar de 100 nm a 900 nm, tal como de 150 nm a 850 nm, tal como de 200 nm a 800 nm, tal como de 250 nm a 750 nm, tal como de 300 nm a 700 nm, e incluyendo un espesor que varía de 350 nm a 650 nm. Cuando las paredes de la cámara de boquilla incluyen más de una capa de recubrimiento de alta reflectividad, el espesor de cada capa puede variar, tal como un espesor de 50 nm o más, tal como 100 nm o más, tal como 150 nm o más, tal como 250 nm o más, tal como 300 nm o más, tal como 500 nm o más, tal como 600 nm o más, e incluyendo un espesor de 750 nm o más.

La cantidad de luz reflejada especularmente por las paredes de la cámara de boquilla puede variar, dependiendo del ángulo de las paredes de la cámara de boquilla, del tipo de revestimiento reflectante, y del espesor del recubrimiento reflectante. En algunos casos, las paredes de la cámara de boquilla tienen una reflectividad del 5 % o más, tal como el 10 % o más, tal como el 15 % o más, tal como el 25 % o más, tal como el 35 % o más, tal como el 50 % o más, tal como el 65 % o más, tal como el 75 % o más, tal como el 85 % o más, tal como el 90 % o más, tal como el 95 % o más, tal como el 97 % o más, e incluyendo una reflectividad del 99 %. En ciertos casos, las paredes de la cámara de boquilla tienen una reflectividad del 100 %.

Cuando las paredes de la cámara de boquilla son reflectantes, las paredes de la cámara de boquilla pueden estar inclinadas para dirigir la luz desde el orificio de boquilla hacia el extremo proximal de la cámara de boquilla. En estas realizaciones, las paredes de la cámara de boquilla pueden configurarse para optimizar la recogida de luz propagada corriente arriba a través del orificio de boquilla por reflexión interna total. Por “optimizar” se entiende que la configuración de las paredes de la cámara de boquilla aumenta la cantidad de luz dirigida hacia el extremo proximal de la cámara de boquilla, tal como en el 5 % o más en comparación con las paredes de la cámara de boquilla que no estén inclinadas para reflejar la luz al extremo proximal de la cámara de boquilla, tal como el 10 % o más, tal como el 15 % o más, tal como el 25 % o más, tal como el 50 % o más, tal como el 75 % o más, tal como el 90 % o más, e

incluyendo configurarse para aumentar la cantidad de luz dirigida hacia el extremo proximal de la cámara de boquilla en el 95 % o más en comparación con las paredes de la cámara de boquilla que no estén inclinadas para dirigir la luz al extremo proximal de la cámara de boquilla. En ciertas realizaciones, las paredes forman un ángulo que varía de 120° a 160° con respecto al eje longitudinal de la corriente de flujo que emana del orificio de boquilla, tal como un ángulo que varía de entre 125° y 155°, tal como de entre 130° y 150°, e incluyendo un ángulo que varía de entre 135° y 145°. En algunas realizaciones, las paredes de la cámara de boquilla forman un ángulo de 140° con respecto al eje longitudinal de la corriente de flujo. En otras realizaciones, las paredes de la cámara de boquilla forman un ángulo de 130° con respecto al eje longitudinal de la corriente de flujo. En ciertas realizaciones, las paredes de la cámara de boquilla forman un ángulo de 135° con respecto al eje longitudinal de la corriente de flujo.

Dependiendo de las características deseadas de la corriente de flujo, el orificio de boquilla de celda de flujo puede ser cualquier forma adecuada donde las formas de sección transversal de interés incluyen, pero sin limitarse a: formas de sección transversal rectilíneas, p. ej., cuadrados, rectángulos, trapezoides, triángulos, hexágonos, etc., formas de sección transversal curvilíneas, p. ej., círculos, óvalos, así como formas irregulares, p. ej., una parte inferior parabólica acoplada a una parte superior plana. En determinadas realizaciones, la boquilla de celda de flujo de interés tiene un orificio circular. El tamaño del orificio de boquilla puede variar, en algunas realizaciones variando de 1 μm a 20000 μm , tal como de 2 μm a 17500 μm , tal como de 5 μm a 15000 μm , tal como de 10 μm a 12500 μm , tal como de 15 μm a 10000 μm , tal como de 25 μm a 7500 μm , tal como de 50 μm a 5000 μm , tal como de 75 μm a 1000 μm , tal como de 100 μm a 750 μm , e incluyendo de 150 μm a 500 μm . En determinadas realizaciones, el orificio de boquilla es de 100 μm . El espesor de pared de la boquilla de celda de flujo en el orificio también puede variar, variando de 0,001 mm a 25 mm, tal como de 0,005 mm a 22,5 mm, tal como de 0,01 mm a 20 mm, tal como de 0,05 mm a 17,5 mm, tal como de 0,1 mm a 15 mm, tal como de 0,25 mm a 12,5 mm, tal como de 0,5 mm a 10 mm, tal como de 0,75 mm a 7,5 mm, e incluyendo de 1 mm a 5 mm. En determinadas realizaciones, el espesor de pared en el orificio de boquilla no es superior a 5 mm, tal como no superior a 4 mm, tal como no superior a 2 mm, tal como no superior a 1 mm, tal como no superior a 0,5 mm, tal como no superior a 0,25 mm, e incluyendo 0,1 mm. Por ejemplo, el espesor de pared en el orificio de boquilla es, en algunos casos, no superior a 0,25 mm. En algunas realizaciones, el espesor de pared en el orificio de boquilla es la mitad (1/2) de la anchura del orificio de boquilla o menos, tal como un tercio (1/3) de la anchura del orificio de boquilla o menos, tal como un cuarto (1/4) de la anchura del orificio de boquilla o menos, tal como un quinto (1/5) de la anchura del orificio de boquilla, e incluyendo un sexto (1/6) de la anchura del orificio de boquilla o menos. Por ejemplo, cuando el orificio de boquilla tiene 2 mm de ancho, el espesor de pared de la celda de flujo en el orificio de boquilla puede ser de 1 mm o menos, tal como de 0,75 mm o menos, tal como de 0,5 mm o menos, e incluyendo de 0,25 mm o menos. Cuando el orificio de boquilla tiene 1 mm de ancho, el espesor de pared de la celda de flujo en el orificio de boquilla puede ser de 0,5 mm o menos, tal como de 0,25 mm o menos, e incluyendo de 0,1275 mm o menos.

En algunas realizaciones, la boquilla de celda de flujo incluye un puerto de inyección de muestra configurado para proporcionar una muestra a la boquilla de celda de flujo. En realizaciones, el sistema de inyección de muestra se configura para proporcionar un flujo de muestra adecuado a la cámara de boquilla de celda de flujo. Dependiendo de las características deseadas de la corriente de flujo, la velocidad de muestra transportada a la cámara de boquilla de celda de flujo mediante el puerto de inyección de muestra, puede ser de 1 $\mu\text{L/s}$ o más, tal como de 2 $\mu\text{L/s}$ o más, tal como de 3 $\mu\text{L/s}$ o más, tal como de 5 $\mu\text{L/s}$ o más, tal como de 10 $\mu\text{L/s}$ o más, tal como de 15 $\mu\text{L/s}$ o más, tal como de 25 $\mu\text{L/s}$ o más, tal como de 50 $\mu\text{L/s}$ o más, e incluyendo de 100 $\mu\text{L/s}$ o más.

El puerto de inyección de muestra puede ser un orificio colocado en una pared de la cámara de boquilla, o puede ser un conducto colocado en el extremo proximal de la cámara de boquilla. Cuando el puerto de inyección de muestra es un orificio colocado en una pared de la cámara de boquilla, el orificio del puerto de inyección de muestra puede ser de cualquier forma adecuada, donde las formas de sección transversal de interés incluyen, pero sin limitarse a: formas de sección transversal rectilíneas, p. ej., cuadrados, rectángulos, trapezoides, triángulos, hexágonos, etc., formas de sección transversal curvilíneas, p. ej., círculos, óvalos, etc., así como formas irregulares, p. ej., una parte inferior parabólica acoplada a una parte superior plana. En ciertas realizaciones, el puerto de inyección de muestra tiene un orificio circular. El tamaño del orificio del puerto de inyección de muestra puede variar dependiendo de la forma, en ciertos casos, con una abertura que varía de 0,5 mm a 2,5 mm, tal como de 0,75 mm a 2,25 mm, tal como de 1 mm a 2 mm, e incluyendo de 1,25 mm a 1,75 mm, por ejemplo, de 1,5 mm.

En ciertos casos, el puerto de inyección de muestra es un conducto colocado en un extremo proximal de la cámara de boquilla de celda de flujo. Por ejemplo, el puerto de inyección de muestra puede ser un conducto colocado para tener el orificio del puerto de inyección de muestra en línea con el orificio de boquilla de celda de flujo. Cuando el puerto de inyección de muestra es un conducto colocado en línea con el orificio de boquilla de celda de flujo, la forma de sección transversal del tubo de inyección de muestra puede ser cualquier forma adecuada donde las formas de sección transversal de interés incluyen, pero sin limitarse a: formas de sección transversal rectilíneas, p. ej., cuadrados, rectángulos, trapezoides, triángulos, hexágonos, etc., formas de sección transversal curvilíneas, p. ej., círculos, óvalos, así como formas irregulares, p. ej., una parte inferior parabólica acoplada a una parte superior plana. El orificio del conducto puede variar dependiendo de la forma, en ciertos casos, con una abertura que varía de 0,5 mm a 2,5 mm, tal como de 0,75 mm a 2,25 mm, tal como de 1 mm a 2 mm, e incluyendo de 1,25 mm a 1,75 mm, por ejemplo, de 1,5 mm. La forma de la punta del puerto de inyección de muestra puede ser la misma o diferente de la forma de sección transversal del tubo de inyección de muestra. Por ejemplo,

el orificio del puerto de inyección de muestra puede incluir una punta biselada que con un ángulo de bisel que varía de 1° a 10°, tal como de 2° a 9°, tal como de 3° a 8°, tal como de 4° a 7°, e incluyendo un ángulo de bisel de 5°.

En algunas realizaciones, la boquilla de celda de flujo también incluye un puerto de inyección de fluido envolvente configurado para proporcionar un fluido envolvente a la boquilla de celda de flujo. En realizaciones, el sistema de inyección de fluido envolvente se configura para proporcionar un flujo de fluido envolvente a la cámara de boquilla de celda de flujo, por ejemplo, junto con la muestra para producir una corriente de flujo laminado de fluido envolvente que rodea la corriente de flujo de muestra. Dependiendo de las características deseadas de la corriente de flujo, la velocidad de fluido envolvente transportada a la cámara de boquilla de celda de flujo por el puede ser de 25 µL/s o más, tal como de 50 µL/s o más, tal como de 75 µL/s o más, tal como de 100 µL/s o más, tal como de 250 µL/s o más, tal como de 500 µL/s o más, tal como de 750 µL/s o más, tal como de 1000 µL/s o más, e incluyendo de 2500 µL/s o más.

En algunas realizaciones, el puerto de inyección de fluido envolvente es un orificio colocado en una pared de la cámara de boquilla. El orificio del puerto de inyección de fluido envolvente puede ser de cualquier forma adecuada, donde las formas de sección transversal de interés incluyen, pero sin limitarse a: formas de sección transversal rectilíneas, p. ej., cuadrados, rectángulos, trapezoides, triángulos, hexágonos, etc., formas de sección transversal curvilíneas, p. ej., círculos, óvalos, así como formas irregulares, p. ej., una parte inferior parabólica acoplada a una parte superior plana. El tamaño del orificio del puerto de inyección de muestra puede variar dependiendo de la forma, en ciertos casos, con una abertura que varía de 0,5 mm a 2,5 mm, tal como de 0,75 mm a 2,25 mm, tal como de 1 mm a 2 mm, e incluyendo de 1,25 mm a 1,75 mm, por ejemplo, de 1,5 mm.

En algunos casos, la boquilla de celda de flujo incluye uno o más componentes de ajuste óptico. Por “ajuste óptico” se entiende que la luz emitida propagada corriente arriba desde la corriente de flujo a través del orificio de boquilla, se cambia según se desee antes de transportarse a un detector (como se describe con mayor detalle a continuación) para la medición. Por ejemplo, el ajuste óptico puede ser aumentar las dimensiones del haz de luz recogido, para enfocar el haz de luz recogido sobre la superficie de un detector o para colimar el haz de luz. En algunos casos, el ajuste óptico es un protocolo de aumento para así aumentar el punto de haz producido por el haz de luz propagado a través del orificio de boquilla por la reflexión interna total dentro de la corriente de flujo, tal como aumentar el punto de haz en un 5 % o más, tal como en un 10 % o más, tal como en un 25 % o más, tal como en un 50 % o más, e incluyendo aumentar las dimensiones del punto de haz en un 75 % o más. En otras realizaciones, el ajuste óptico incluye enfocar el haz de luz recogido para así reducir las dimensiones del punto del haz, tal como en % o más, tal como en un 10 % o más, tal como en un 25 % o más, tal como en un 50 % o más, e incluyendo reducir las dimensiones del punto del haz en un 75 % o más.

En ciertas realizaciones, el ajuste óptico incluye colimar la luz dirigida hacia el extremo proximal de la boquilla de celda de flujo. El término “colimar” se utiliza en su sentido convencional para referirse al ajuste ópticamente de la colinealidad de propagación de luz, o reducir la divergencia por la luz de un eje común de propagación. En algunos casos, la colimación incluye el estrechamiento de la sección transversal espacial de un haz de luz.

Los componentes de ajuste óptico pueden ser cualquier dispositivo o estructura conveniente que proporcione el cambio deseado en la luz recogida, y puede incluir, pero sin limitarse a, lentes, espejos, estenopos, hendiduras, rejillas, refractores de luz, y cualquier combinación de los mismos. Las boquillas de celda de flujo pueden incluir uno o más componentes de ajuste óptico según sea necesario, tales como dos o más, tales como tres o más, tales como cuatro o más, e incluyendo cinco o más componentes de ajuste óptico.

En algunas realizaciones, la boquilla de celda de flujo y el componente de ajuste óptico están en comunicación óptica, pero no están físicamente en contacto. Dependiendo del tamaño de la cámara de boquilla de celda de flujo, el componente de ajuste óptico puede colocarse desde el extremo proximal de la cámara de boquilla de celda de flujo a una distancia que sea de 0,05 mm o más, de 0,1 mm o más, tal como de 0,2 mm o más, tal como de 0,5 mm o más, tal como de 1 mm o más, tal como de 5 mm o más, tal como de 10 mm o más, tal como de 25 mm o más, tal como de 50 mm o más, incluyendo de 100 mm o más. En otras realizaciones, el componente de ajuste óptico está físicamente acoplado a la boquilla de celda de flujo, tal como con un adhesivo, moldeado conjuntamente o integrado conjuntamente en una carcasa que tiene el componente de ajuste óptico colocado adyacente al extremo proximal de la boquilla de celda de flujo. Como tal, el componente de ajuste óptico y la boquilla de celda de flujo pueden integrarse en una sola unidad.

En algunas realizaciones, el componente de ajuste óptico es una lente de enfoque con una relación de aumento de desde 0,1 a 0,95, tal como una relación de aumento de desde 0,2 a 0,9, tal como una relación de aumento de desde 0,3 a 0,85, tal como una relación de aumento de desde 0,35 a 0,8, tal como una relación de aumento de desde 0,5 a 0,75, e incluyendo una relación de aumento de desde 0,55 a 0,7, por ejemplo, una relación de aumento de 0,6. Por ejemplo, la lente de enfoque es, en ciertos casos, una lente acromática doble de demagnificación con una relación de aumento de aproximadamente 0,6. Dependiendo de la distancia entre el orificio de boquilla y la lente, el tamaño de la cámara de boquilla de celda de flujo, la longitud focal de la lente de enfoque puede variar, variando de 5 mm a 20 mm, tal como de 6 mm a 19 mm, tal como de 7 mm a 18 mm, tal como de 8 mm a 17 mm, tal como de 9 mm a 16, e incluyendo una longitud focal que varía de 10 mm a 15 mm. En determinadas realizaciones, la lente de enfoque tiene una longitud focal de aproximadamente 13 mm.

En otras realizaciones, el componente de ajuste óptico es un colimador. El colimador puede ser cualquier protocolo de colimación conveniente, tal como uno o más espejos o lentes curvas, o una combinación de los mismos. Por

ejemplo, el colimador es en determinados casos una única lente de colimación. En otros casos, el colimador es un espejo de colimación. En aún otros casos, el colimador incluye dos lentes. En otros casos más, el colimador incluye un espejo y una lente. Cuando el colimador incluye una o más lentes, la longitud focal de la lente de colimación puede variar, variando de 5 mm a 40 mm, tal como de 6 mm a 37,5 mm, tal como de 7 mm a 35 mm, tal como de 8 mm a 32,5 mm, tal como de 9 mm a 30 mm, tal como de 10 mm a 27,5 mm, tal como de 12,5 mm a 25 mm, e incluyendo una longitud focal que varía de 15 mm a 20 mm.

En determinadas realizaciones, el componente de ajuste óptico es un separador de longitud de onda. El término “separador de longitud de onda” se utiliza en la presente memoria en su sentido convencional para referirse a un protocolo óptico para separar la luz policromática en sus longitudes de onda componentes para su detección. La separación de longitud de onda, según ciertas realizaciones, puede incluir hacer pasar o bloquear selectivamente longitudes de onda específicas o intervalos de longitud de onda de la luz policromática. Los protocolos de separación de longitud de onda de interés que pueden ser parte de o combinados con las boquillas de celda de flujo objeto, incluyen, pero sin limitarse a, vidrio coloreado, filtros de paso de banda, filtros de interferencia, espejos dicróicos, rejillas de difracción, monocromadores y combinaciones de los mismos, entre otros protocolos de separación de longitud de onda.

Dependiendo de la fuente de luz y de la muestra que se está analizando, las boquillas de celda de flujo objeto pueden incluir uno o más separadores de longitud de onda, tales como dos o más, tales como tres o más, tales como cuatro o más, tales como cinco o más, e incluyendo 10 o más separadores de longitud de onda. Cuando los sistemas incluyen dos o más separadores de longitud de onda, los separadores de longitud de onda pueden utilizarse individualmente o en serie, para separar la luz policromática en longitudes de onda componentes. En algunas realizaciones, los separadores de longitud de onda se disponen en serie. En otras realizaciones, los separadores de longitud de onda se disponen individualmente de manera que se lleven a cabo una o más mediciones para recoger la luz mediante el uso de cada uno de los separadores de longitud de onda.

En algunas realizaciones, las boquillas de celda de flujo objeto incluyen uno o más filtros ópticos. En determinados casos, los filtros ópticos incluyen un filtro de paso de banda con anchos de banda mínimos que varían de 2 nm a 100 nm, tal como de 3 nm a 95 nm, tal como de 5 nm a 95 nm, tal como de 10 nm a 90 nm, tal como de 12 nm a 85 nm, tal como de 15 nm a 80 nm, e incluyendo filtros de paso de banda con anchos de banda mínimos que varían de 20 nm a 50 nm.

En algunos casos, la luz emitida por la muestra en la corriente de flujo se propaga corriente arriba a través del orificio de boquilla mediante reflexión interna total. Cuando las boquillas de celda de flujo objeto incluyen uno o más componentes de ajuste óptico configurados para recoger y ajustar la luz emitida a través del orificio de boquilla, la distancia entre el orificio de boquilla y el componente de ajuste óptico puede variar. Dependiendo del tamaño de la boquilla de celda de flujo y del ajuste óptico deseado, el orificio de boquilla y el componente de ajuste óptico pueden estar separados por 5 mm o más, tal como por 10 mm o más, tal como por 25 mm o más, tal como por 35 mm o más, tal como por 50 mm o más, tal como por 65 mm o más, tal como por 75 mm o más, tal como por 100 mm o más, tal como por 250 mm o más, e incluyendo por 500 mm o más. Por ejemplo, la distancia entre el orificio de boquilla y el componente de ajuste óptico puede variar de 5 mm a 500 mm, tal como de 10 mm a 400 mm, tal como de 15 mm a 300 mm, tal como de 25 mm a 250 mm, tal como de 35 mm a 200 mm, e incluyendo de 50 mm a 100 mm.

Los diagramas esquemáticos de las Figuras 1A y 1B ilustran diversos aspectos de las boquillas de celda de flujo según determinadas realizaciones. La Figura 1A es una vista superior de la boquilla 100 que incluye uno o más puertos 110 de inyección de fluido envolvente para proporcionar fluido envolvente a la cámara de boquilla. Se proporciona un puerto 115 de inyección de muestra para dirigir una muestra, tal como una muestra biológica, a la cámara de boquilla y, posteriormente, ambos líquidos pueden dirigirse al orificio de boquilla como una corriente de flujo.

La Figura 1B representa una ilustración esquemática en sección transversal de una boquilla de celda de flujo según determinadas realizaciones. La Figura 1B muestra la cámara 120 de boquilla que proporciona una carcasa para el sistema 145 de lentes. El sistema de lentes puede incluir una, dos o más lentes que se configuran para dirigir la luz de señal a un dispositivo de recogida de luz. La cámara 120 de boquilla incluye el puerto 110 de inyección envolvente y el puerto 115 de inyección de muestra. Estos puertos proporcionan el suministro de muestra y fluido envolvente a la cámara de boquilla. Estos materiales salen de la cámara 120 de boquilla a través del orificio 140 de boquilla como corriente 150 de flujo. Como se describió anteriormente, el orificio 140 de boquilla puede tener cualquier tamaño adecuado según se desee, tal como entre 1 μ m y 2 mm de diámetro, incluido entre 1 y 2 mm. La distancia entre el orificio 140 de boquilla y una primera lente en el sistema 145 de lentes puede ser cualquier distancia tal como entre 1 y 500 mm, incluyendo entre 2 y 100 mm. En algunas realizaciones, la cámara de flujo puede incluir paredes inclinadas internamente que forman un ángulo entre 130° y 150° con respecto al vector del canal de flujo. En algunas realizaciones, el espesor de la punta de boquilla en el orificio 140 puede no ser más de un 1/4 de la anchura del canal de flujo, tal como no más de 0,5 mm, incluyendo no más de 0,25 mm.

El canal 150 de flujo sale del orificio 140 de boquilla y pasa a través de un campo 160 de interrogación donde la luz de la fuente 170 de luz irradia la corriente de flujo. En algunas realizaciones, una parte de la luz dispersada y/o emitida desde la muestra puede salir de la corriente de flujo, donde puede detectarse con uno o más detectores. En algunos casos, la luz 180 se refleja internamente a lo largo de las paredes por la reflexión interna total hacia arriba de la corriente de flujo, actuando las paredes como una guía de onda para la luz. Una parte de la luz 180 de reflexión interna total se recoge por el sistema 145 de lentes en la cámara 120 de boquilla. En algunas realizaciones,

más del 90 % de la luz emitida desde el orificio 140 puede recogerse por el sistema 145 de lentes. El sistema de lentes puede dirigir la luz a un sistema de recogida de luz (como se describe con mayor detalle a continuación), tal como una cámara CCD u otro dispositivo para recoger y/o cuantificar una señal de luz.

5 Sistemas para medir la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo

Los aspectos de la presente descripción incluyen sistemas para medir la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo. En realizaciones de la presente descripción, los sistemas objeto se configuran para medir la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo que se propaga corriente arriba a través del orificio de boquilla de celda de flujo por reflexión interna total por el medio fluido de la corriente de flujo. Como se explicó anteriormente, el término “corriente arriba” se refiere a la luz emitida propagada y recogida en una dirección que es opuesta a la dirección del flujo de fluido por la corriente de flujo. En otras palabras, cuando la boquilla de celda de flujo se coloca para generar una corriente de flujo que atraviesa la dirección Y positiva a lo largo del eje Y en un plano X-Y, las boquillas de celda de flujo se configuran para propagar la luz en la dirección Y negativa. Asimismo, cuando la boquilla de celda de flujo se coloca para generar una corriente de flujo que atraviesa la dirección X positiva a lo largo del eje X en un plano X-Y, las boquillas de celda de flujo se configuran para propagar la luz en la dirección X negativa.

Como se explicó anteriormente, la luz medida por los sistemas objeto es la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo que se propaga corriente arriba a través del orificio de boquilla a la cámara de boquilla mediante reflexión interna total. Como tal, la luz medida en las realizaciones de la presente descripción incluye luz que se propaga dentro de los límites de un medio fluido, de manera que la luz permanezca dentro de los límites del medio de la corriente de flujo. Como se describe con mayor detalle a continuación, en algunas realizaciones, una fuente de luz irradia una corriente de flujo en un campo de detección corriente abajo del orificio de boquilla, y los sistemas objeto se configuran para medir luz que se propaga corriente arriba de vuelta a la cámara de boquilla de celda de flujo a través del orificio de boquilla por reflexión interna total.

Como se resumió anteriormente, los sistemas incluyen una o más boquillas de celda de flujo (como se describió anteriormente), una fuente de luz para irradiar una corriente de flujo que emana del orificio de boquilla, y un detector para medir la luz emitida por una muestra en la corriente de flujo propagada corriente arriba a través del orificio de boquilla por reflexión interna total.

En realizaciones, los sistemas incluyen una o más fuentes de luz para irradiar la corriente de flujo con luz en uno o más campos de interrogación. Por “campo de interrogación” se entiende la región de la corriente de flujo que se irradia por la una o más fuentes de luz. Los campos de interrogación pueden variar dependiendo de las propiedades de la corriente de flujo que se interroge. En realizaciones, el campo de interrogación puede abarcar 0,001 mm o más de la corriente de flujo, tal como 0,005 mm o más, tal como 0,01 mm o más, tal como 0,05 mm o más, tal como 0,1 mm o más, tal como 0,5 mm o más, e incluyendo 1 mm o más de la corriente de flujo. Por ejemplo, el campo de interrogación puede ser una sección transversal plana de la corriente de flujo irradiada, tal como, con un láser enfocado. En otro ejemplo, el campo de detección puede ser una longitud predeterminada de la corriente de flujo, tal como, por ejemplo, correspondiente al perfil de irradiación de un rayo láser difuso o una lámpara.

En algunas realizaciones, los sistemas de interés incluyen una o más fuentes de luz que se colocan para interrogar la corriente de flujo en o cerca de la abertura de boquilla de celda de flujo. Por ejemplo, el campo de interrogación puede ser de aproximadamente 0,001 mm o más desde el orificio de boquilla, tal como 0,005 mm o más, tal como 0,01 mm o más, tal como 0,05 mm o más, tal como 0,1 mm o más, tal como 0,5 mm o más, e incluyendo 1 mm o más desde el orificio de boquilla. En otras palabras, la corriente de flujo se irradia en una región que es de 0,001 mm o más desde el orificio de boquilla, tal como 0,005 mm o más, tal como 0,01 mm o más, tal como 0,05 mm o más, tal como 0,1 mm o más, tal como 0,5 mm o más, e incluye irradiar la corriente de flujo en una región que se coloca 1 mm o más desde el orificio de boquilla.

En algunas realizaciones, los sistemas de interés se configuran para irradiar la corriente de flujo en o cerca del punto de ruptura de la corriente de flujo. El término “punto de ruptura” se utiliza en la presente memoria en su sentido convencional para referirse al punto en la corriente de flujo en el que la corriente de flujo continuo comience a formar gotas. Por ejemplo, el campo de interrogación puede colocarse a aproximadamente 0,001 mm o más desde el punto de ruptura de la corriente de flujo, tal como a 0,005 mm o más, tal como a 0,01 mm o más, tal como a 0,05 mm o más, tal como a 0,1 mm o más, tal como a 0,5 mm o más, e incluyendo 1 mm o más desde el punto de ruptura de la corriente de flujo. En otras palabras, la corriente de flujo se irradia en una región que es de 0,001 mm o más de punto de ruptura, tal como 0,005 mm o más, tal como 0,01 mm o más, tal como 0,05 mm o más, tal como 0,1 mm o más, tal como 0,5 mm o más, e incluyendo irradiar la corriente de flujo en una región que se coloca 1 mm o más desde el punto de ruptura.

Los sistemas incluyen una o más fuentes de luz para irradiar la corriente de flujo con luz en uno o más campos de interrogación. En algunas realizaciones, la fuente de luz es una fuente de luz de banda ancha, que emite luz con una amplia gama de longitudes de onda, tal como, por ejemplo, que abarca 50 nm o más, tal como 100 nm o más, tal como 150 nm o más, tal como 200 nm o más, tal como 250 nm o más, tal como 300 nm o más, tal como 350 nm o más, tal como 400 nm o más, e incluyendo abarcar 500 nm o más. Por ejemplo, una fuente de luz de banda ancha adecuada emite luz con longitudes de onda de 200 nm a 1500 nm. Otro ejemplo de una fuente de luz de banda ancha adecuada incluye una fuente de luz que emite luz con longitudes de onda de 400 nm a 1000 nm. Puede emplearse cualquier protocolo de fuente de luz de banda ancha conveniente, tal como una lámpara halógena, una lámpara de arco de deuterio, una lámpara de arco de xenón, una

fuelle de luz de banda ancha acoplada con fibra estabilizada, un LED de banda ancha con un espectro continuo, un diodo emisor superluminiscente, un diodo emisor de luz semiconductor, una fuente de luz blanca LED de amplio espectro, una fuente de luz blanca integrada multiLED, entre otras fuentes de luz de banda ancha, o cualquier combinaci3n de las mismas.

5 En otras realizaciones, la fuente de luz es una fuente de luz de banda estrecha que emite una longitud de onda particular o un intervalo estrecho de longitudes de onda. En algunos casos, las fuentes de luz de banda estrecha emiten luz con un intervalo estrecho de longitudes de onda, tal como, por ejemplo, 50 nm o menos, tal como 40 nm o menos, tal como 30 nm o menos, tal como 25 nm o menos, tal como 20 nm o menos, tal como 15 nm o menos, tal como 10 nm o menos, tal como 5 nm o menos, tal como 2 nm o menos, e incluyendo fuentes de luz que emitan una longitud de onda espec3fica de luz (es decir, luz monocromática). Puede emplearse cualquier protocolo de fuente de luz de banda estrecha conveniente, tal como
10 un LED de longitud de onda estrecho, diodo láser o una fuente de luz de banda ancha acoplada a uno o más filtros de paso de banda ópticos, rejillas de difracci3n, monocromadores o cualquier combinaci3n de los mismos.

En determinadas realizaciones, la fuente de luz es un láser. En algunos casos, los sistemas objeto incluyen un láser de gas, tal como un láser de helio-ne3n, un láser de arg3n, un láser kript3n, un láser de xen3n, un láser de nitr3geno, un láser de CO₂, un láser de CO, un láser excímero de arg3n-flúor (ArF), un láser excímero de krypt3n-flúor (KrF), un láser excímero de cloro de xen3n (XeCl), o un láser excímero de xen3n (XeF), o una combinaci3n de los mismos. En otros casos, los sistemas objeto incluyen un láser de tinte, tal como un láser de estilbena, de cumarina o de rodamina. En otros casos, los láseres de interés incluyen un láser de metal-vapor, tal como un láser de helio-cadmio (HeCd), un láser de helio-mercurio (HeHg), un
20 láser de helio-selenio (HeSe), un láser de helio-plata (HeAg), un láser de estroncio, un láser de ne3n-cobre (NeCu), un láser de cobre o un láser de oro, y combinaciones de los mismos. En a3n otros casos, los sistemas objeto incluyen un láser de estado s3lido, tal como un láser de rub3, un láser Nd:YAG, un láser NdCrYAG, un láser Er:YAG, un láser Nd:YLF, un láser Nd:YVO₄, un láser Nd:YCa₄O(BO₃)₃, un láser Nd:YCOB, un láser de zafiro de titanio, un láser de tulio YAG, un láser de iterbio YAG, un láser de iterbio₂O₃, o láseres dopados con cerio, y combinaciones de los mismos.

Los sistemas objeto pueden incluir una o más fuentes de luz, seg3n se desee, tales como dos o más fuentes de luz, tales como tres o más fuentes de luz, tales como cuatro o más fuentes de luz, tales como cinco o más fuentes de luz, e incluyendo diez o más fuentes de luz. La fuente de luz puede incluir cualquier combinaci3n de tipos de fuentes de luz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los sistemas objeto incluyen una matriz de láseres, tal como una matriz
30 que tenga uno o más láseres de gas, uno o más láseres de tinte, y uno o más láseres de estado s3lido. En otros casos, cuando se emplean dos fuentes de luz, una primera fuente de luz puede ser una fuente de luz blanca de banda ancha (p. ej., LED de luz blanca de banda ancha), y una segunda fuente de luz puede ser una fuente de luz cercana a infrarroja de banda ancha (p. ej., LED de banda ancha cercano a infrarrojo). En otros casos, cuando se emplean dos fuentes de luz, una primera fuente de luz puede ser una fuente de luz blanca de banda ancha (p. ej., LED de luz blanca de banda ancha) y la segunda fuente de luz puede ser una fuente de luz de espectro estrecho (p. ej., LED o láser cercano a infrarrojo). En a3n otros casos, la fuente de luz es una pluralidad de fuentes de luz de banda estrecha que emiten cada una longitudes de onda espec3ficas, tales como dos o más láseres, tales como tres o más láseres, incluyendo 5 o más láseres. En otros casos más, la fuente de luz es una matriz de dos o más LED, tal como una matriz de tres o más LED, tal como una matriz de cinco o más LED, incluyendo una matriz de diez o más LED.

En algunas realizaciones, las fuentes de luz emiten luz con longitudes de onda que var3an de 200 nm a 1500 nm, tal como de 250 nm a 1250 nm, tal como de 300 nm a 1000 nm, tal como de 350 nm a 900 nm, e incluyendo de 400 nm a 800 nm. Por ejemplo, la fuente de luz puede incluir una fuente de luz de banda ancha que emite luz con longitudes de onda de 200 nm a 900 nm. En otros casos, la fuente de luz incluye una pluralidad de fuentes de luz de banda estrecha que emiten longitudes
45 de onda que var3an de 200 nm a 900 nm. Por ejemplo, la fuente de luz puede ser una pluralidad de LED de banda estrecha (1 nm-25 nm) que cada uno emite de forma independiente luz con un intervalo de longitudes de onda entre 200 nm a 900 nm. En algunas realizaciones, la fuente de luz de banda estrecha es una o más lámparas de banda estrecha que emiten luz en el intervalo de 200 nm a 900 nm, tal como una lámpara de cadmio de banda estrecha, una lámpara de cesio, una lámpara de helio, una lámpara de mercurio, una lámpara de mercurio-cadmio, una lámpara de potasio, una lámpara de sodio, una lámpara de ne3n, una lámpara de zinc o cualquier combinaci3n de las mismas. En otras realizaciones, la fuente de luz de banda estrecha incluye uno o más láseres que emiten luz en el intervalo de 200 nm a 1000 nm, tales como láseres de gas, láseres excímero, láseres de tinte, láseres de vapor de metal, y láser de estado s3lido como se describi3 anteriormente.

Dependiendo del protocolo de ensayo, los sistemas objeto pueden configurarse para irradiar la corriente de flujo en intervalos continuos o discretos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los sistemas pueden configurarse para irradiar la corriente de flujo continuamente. Cuando la luz incluye dos o más fuentes de luz, la corriente de flujo puede irradiarse continuamente por todas las fuentes de luz simultáneamente. En otros casos, la corriente de flujo se irradia continuamente con cada fuente de luz secuencialmente. En otras realizaciones, la corriente de flujo se puede irradiar en intervalos regulares, tal como irradiar la muestra cada 0,001 microsegundos, cada 0,01 microsegundos, cada 0,1 microsegundos
60 cada 1 microsegundo, cada 10 microsegundos, cada 100 microsegundos, e incluyendo cada 1000 microsegundos.

La corriente de flujo puede irradiarse con la fuente de luz una o más veces en cualquier per3odo de medici3n dado, tal como 2 o más veces, tal como 3 o más veces, incluyendo 5 o más veces en cada per3odo de medici3n.

65 Cuando se emplea más de una fuente de luz, la corriente de flujo puede irradiarse en el campo de interrogaci3n con las fuentes de luz simultáneamente o secuencialmente, o una combinaci3n de las mismas. Por ejemplo, cuando la

corriente de flujo se irradia con dos láseres, los sistemas objeto pueden configurarse para irradiar simultáneamente la corriente de flujo con ambos láseres. En otras realizaciones, la corriente de flujo en el campo de interrogación se irradia secuencialmente por dos láseres. Cuando la muestra se irradia secuencialmente con dos o más láseres, el tiempo que cada fuente de luz irradia la corriente de flujo puede ser independientemente 0,001 microsegundos o más, tal como 0,01 microsegundos o más, tal como 0,1 microsegundos o más, tal como 1 microsegundo o más, tal como 5 microsegundos o más, tal como 10 microsegundos o más, tal como 30 microsegundos o más, e incluyendo 60 microsegundos o más. Por ejemplo, el láser puede configurarse para irradiar la corriente de flujo durante un período que varía de 0,001 microsegundos a 100 microsegundos, tal como de 0,01 microsegundos a 75 microsegundos, tal como de 0,1 microsegundos a 50 microsegundos, tal como de 1 microsegundo a 25 microsegundos, e incluyendo de 5 microsegundos a 10 microsegundos. En realizaciones en las que la corriente de flujo se irradia secuencialmente por dos o más láseres, la duración de la corriente de flujo que se irradia por cada fuente de luz puede ser igual o diferente.

El período de tiempo entre la irradiación de la corriente de flujo en el campo de interrogación por cada fuente de luz también puede variar, según se desee, separado independientemente por un retardo de 0,001 microsegundos o más, tal como 0,01 microsegundos o más, tal como 0,1 microsegundos o más, tal como 1 microsegundo o más, tal como 5 microsegundos o más, tal como de 10 microsegundos o más, tal como de 15 microsegundos o más, tal como de 30 microsegundos o más, e incluyendo de 60 microsegundos o más. Por ejemplo, el período de tiempo entre la irradiación de la corriente de flujo en el campo de interrogación por cada fuente de luz puede variar de 0,001 microsegundos a 60 microsegundos, tal como de 0,01 microsegundos a 50 microsegundos, tal como de 0,1 microsegundos a 35 microsegundos, tal como de 1 microsegundo a 25 microsegundos, e incluyendo de 5 microsegundos a 10 microsegundos. En determinadas realizaciones, el período de tiempo entre la irradiación de la corriente de flujo en el campo de interrogación por cada fuente de luz es de 10 microsegundos. En realizaciones en las que los sistemas objeto se configuran para irradiar secuencialmente la corriente de flujo por más de dos (es decir, tres o más) fuentes de luz, el retardo entre la irradiación por cada fuente de luz puede ser igual o diferente.

La fuente de luz puede colocarse a una distancia de la corriente de flujo que varía dependiendo del tipo de fuente de luz y de las características de la corriente de flujo (p. ej., la anchura de la corriente de flujo). Por ejemplo, la fuente de luz puede colocarse a 0,01 mm o más de la corriente de flujo, tal como a 0,05 mm o más, tal como a 0,1 mm o más, tal como a 0,5 mm o más, tal como a 1 mm o más, tal como a 2,5 mm o más, tal como a 5 mm o más, tal como a 10 mm o más, tal como a 15 mm o más, tal como a 25 mm o más, e incluyendo a 50 mm o más de la corriente de flujo. La fuente de luz también puede colocarse en un ángulo con respecto al flujo de flujo en cada campo de interrogación que también varíe. Por ejemplo, la fuente de luz puede colocarse en un ángulo con respecto al eje de la corriente de flujo que varía de 10° a 90°, tal como de 15° a 85°, tal como de 20° a 80°, tal como de 25° a 75°, e incluyendo de 30° a 60°. En ciertas realizaciones, la fuente de luz se coloca en un ángulo de 90° con respecto al eje de la corriente de flujo.

Como se explicó anteriormente, en realizaciones de la presente descripción, los sistemas objeto se configuran para medir la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo que se propaga corriente arriba por reflexión interna total por el medio de la corriente de flujo. Los sistemas objeto se configuran para irradiar la corriente de flujo con una fuente de luz en un campo de interrogación corriente abajo del orificio de la boquilla de flujo, y se configuran para medir la luz que se propaga corriente arriba de vuelta a la cámara de boquilla de la celda de flujo a través del orificio de boquilla por reflexión interna total. En las realizaciones, los sistemas incluyen uno o más detectores configurados para medir la luz emitida por la muestra.

Como se describió anteriormente, las celdas de flujo de interés incluyen una cámara de boquilla con un extremo distal con un orificio de boquilla en comunicación fluida con la corriente de flujo y un extremo proximal donde se dirige la luz propagada corriente arriba. Por ejemplo, ciertas boquillas de celda de flujo incluyen una parte cilíndrica proximal que define un eje longitudinal, y una parte frustocónica distal que termina en una superficie plana que tiene el orificio de boquilla que es transversal al eje longitudinal.

Los sistemas de la presente descripción también incluyen uno o más detectores. En algunas realizaciones, uno o más detectores se colocan en el extremo proximal de la cámara de boquilla. Cuando la boquilla de celda de flujo incluye una parte cilíndrica proximal y una parte frustocónica distal, el uno o más detectores pueden colocarse en o cerca del extremo proximal de la cámara de boquilla. Las Figuras 2A-2B ilustran una configuración de un detector colocado en o cerca del extremo proximal de la cámara de boquilla de celda de flujo.

La Figura 2A representa la colocación de un detector con respecto a la boquilla de celda de flujo según algunas realizaciones de la presente descripción. La boquilla 200a de celda de flujo tiene una cámara de boquilla que incluye una parte 210a cilíndrica proximal y una parte 220a frustocónica distal. La parte 220a frustocónica distal incluye el orificio 221a de boquilla que está en comunicación fluida con la corriente 222a de flujo. La parte frustocónica distal incluye paredes 225a laterales inclinadas que pueden ser reflectantes e inclinadas para dirigir la luz 250a hacia el extremo proximal 215a de la boquilla 221a de celda de flujo (como se describió anteriormente). La Figura 2A representa una configuración ilustrativa donde el detector 230a se coloca adyacente al extremo proximal 210a de la cámara de boquilla de celda de flujo.

La Figura 2B representa la ubicación de un detector con la boquilla de celda de flujo según otras realizaciones de la presente descripción. La boquilla 200b de celda de flujo tiene una cámara de boquilla de forma frustocónica que incluye un extremo proximal 210b y un extremo distal 220b. El extremo distal 220b incluye un orificio 221b de boquilla que está en comunicación fluida con la corriente 222b de flujo. El extremo distal 220b también incluye paredes 225b

laterales inclinadas que pueden ser reflectantes e inclinadas para dirigir la luz 250b hacia el extremo proximal 210b de la cámara de boquilla de celda de flujo. La Figura 2B representa una configuración ilustrativa donde el detector 230b está colocado adyacente al extremo proximal 210b de la cámara de boquilla de celda de flujo.

- 5 Los detectores de interés pueden incluir, pero sin limitarse a, sensores ópticos o fotodetectores, tales como sensores de píxeles activos (APS), fotodiodos de avalancha, sensores de imagen, dispositivos de carga acoplada (CCD), dispositivos de carga acoplada intensificada (ICCD), diodos emisores de luz, contadores de fotones, bolómetros, detectores piroeléctricos, fotorresistores, células fotovoltaicas, fotodiodos, tubos fotomultiplicadores, fototransistores, fotoconductores o fotodiodos de puntos cuánticos, y combinaciones de los mismos, entre otros
- 10 fotodetectores. En determinadas realizaciones, la luz transmitida se mide con un dispositivo de carga acoplada (CCD), dispositivos de carga acoplada de semiconductores (CCD), sensores de píxeles activos (APS), sensores de imagen complementarios de semiconductores de óxido metálico (CMOS), o sensores de imagen de semiconductores de óxido metálico de tipo N (NMOS). En algunas realizaciones, el sensor de imágenes es una cámara CCD. Por ejemplo, la cámara puede ser una cámara CCD multiplicadora de electrones (EMCCD) o una
- 15 cámara CCD intensificada (ICCD). En otras realizaciones, el sensor de formación de imágenes es una cámara de tipo CMOS. Cuando la luz transmitida se mide con un CCD, el área superficial de detección activa del CCD puede variar, tal como desde 0,01 cm² a 10 cm², tal como desde 0,05 cm² a 9 cm², tal como desde, tal como desde 0,1 cm² a 8 cm², tal como desde 0,5 cm² a 7 cm², e incluyendo desde 1 cm² a 5 cm².
- 20 El número de fotodetectores en los sistemas objeto puede variar, según se desee. Por ejemplo, los sistemas objeto pueden incluir un fotodetector o más, tal como dos fotodetectores o más, tal como tres fotodetectores o más, tal como cuatro fotodetectores o más, tal como cinco fotodetectores o más, e incluyendo diez fotodetectores o más. En determinadas realizaciones, los sistemas incluyen un fotodetector. En otras realizaciones, los sistemas incluyen
- 25 dos fotodetectores. Cada fotodetector puede orientarse con respecto al extremo proximal de la boquilla de celda de flujo (como se hace referencia en un plano X-Y) en un ángulo que varía, tal como en un ángulo de 60° o menos, tal como 55° o menos, tal como 50° o menos, tal como 45° o menos, tal como 30° o menos, tal como 15° o menos, tal como 10° o menos, e incluyendo orientar el fotodetector de manera que la superficie de detección activa se oriente hacia el extremo proximal de la boquilla de celda de flujo (Figuras 3a y 3b)
- 30 Cuando los sistemas objeto incluyen más de un fotodetector, cada fotodetector puede ser el mismo, o la colección de dos o más fotodetectores puede ser una combinación de diferentes fotodetectores. Por ejemplo, cuando los sistemas objeto incluyen dos fotodetectores, en algunas realizaciones el primer fotodetector es un dispositivo de tipo CCD y el segundo fotodetector (o sensor de imagen) es un dispositivo de tipo CMOS. En otras realizaciones, tanto el primer como el segundo fotodetectores son dispositivos de tipo CCD. En otras realizaciones más, tanto el primer como el
- 35 segundo fotodetectores son dispositivos de tipo CMOS. En otras realizaciones más, el primer fotodetector es un dispositivo de tipo CCD y el segundo fotodetector es un tubo fotomultiplicador. En otras realizaciones más, el primer fotodetector es un dispositivo de tipo CMOS y el segundo fotodetector es un tubo fotomultiplicador. En otras realizaciones más, tanto el primer como el segundo fotodetectores son tubos fotomultiplicadores.
- 40 En realizaciones de la presente descripción, los detectores de interés se configuran para medir la luz emitida por una muestra en la corriente de flujo en una o más longitudes de onda, tal como en 2 o más longitudes de onda, tal como en 5 o más longitudes de onda diferentes, tales como en 10 o más longitudes de onda diferentes, tales como en 25 o más longitudes de onda diferentes, tales como en 50 o más longitudes de onda diferentes, tales como en 100 o más longitudes de onda diferentes, tal como en 200 o más longitudes de onda diferentes, tal como en 300 o más longitudes de onda diferentes, e
- 45 incluyendo medir la luz emitida por una muestra en la corriente de flujo en 400 o más longitudes de onda diferentes.
- En algunas realizaciones, los detectores de interés se configuran para medir la luz emitida por una muestra en la corriente de flujo en un intervalo de longitudes de onda (p. ej., 200 nm-1000 nm). En determinadas realizaciones, los detectores de interés se configuran para recoger espectros de luz en un intervalo de longitudes de onda. Por ejemplo, los sistemas pueden
- 50 incluir uno o más detectores configurados para recoger espectros de luz en uno o más de los intervalos de longitud de onda de 200 nm-1000 nm. En otras realizaciones más, los detectores de interés se configuran para medir la luz emitida por una muestra en la corriente de flujo en una o más longitudes de onda específicas. Por ejemplo, los sistemas pueden incluir uno o más detectores configurados para medir luz en uno o más de 450 nm, 518 nm, 519 nm, 561 nm, 578 nm, 605 nm, 607 nm, 625 nm, 650 nm, 660 nm, 667 nm, 670 nm, 668 nm, 695 nm, 710 nm, 723 nm, 780 nm, 785 nm, 647 nm, 617 nm, y cualquier
- 55 combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, uno o más detectores pueden configurarse para emparejarse con fluoróforos específicos, tales como los utilizados con la muestra en un ensayo de fluorescencia.
- En realizaciones, el detector se configura para medir luz continua o en intervalos discretos. En algunos casos, los detectores de interés se configuran para realizar mediciones de la luz emitida por una muestra en la corriente de flujo
- 60 continuamente. En otros casos, los detectores de interés se configuran para realizar mediciones en intervalos discretos, tales como medir la luz cada 0,001 milisegundos, cada 0,01 milisegundos, cada 0,1 milisegundos, cada 1 milisegundo, cada 10 milisegundos, cada 100 milisegundos, e incluyendo cada 1000 milisegundos, o algún otro intervalo.
- En algunos casos, el fotodetector también incluye un componente de ajuste óptico. En algunos casos, el ajuste
- 65 óptico es un protocolo de aumento configurado para aumentar el tamaño del campo de la luz capturada por el detector, tal como en un 5 % o más, tal como en un 10 % o más, tal como en un 25 % o más, tal como en un 50 %

o más, e incluyendo aumentar el campo de la luz capturada por el detector en un 75 % o más. En otros casos, el ajuste óptico es un protocolo de demagnificación configurado para disminuir el campo de la luz capturada por el detector, tal como en un 5 % o más, tal como en un 10 % o más, tal como en un 25 % o más, tal como en un 50 % o más, e incluyendo disminuir el campo de la luz capturada por el detector en un 75 % o más. En determinadas realizaciones, el ajuste óptico es un protocolo de enfoque configurado para enfocar la luz recogida por el detector, tal como enfocando el haz de luz recogida en un 5 % o más, tal como en un 10 % o más, tal como en un 25 % o más, tal como en un 50 % o más, e incluyendo enfocar el haz de luz recogida en un 75 % o más.

Los componentes de ajuste óptico pueden ser cualquier dispositivo o estructura conveniente que proporcione el cambio deseado en el haz de luz recogida, y puede incluir, pero sin limitarse a, lentes, espejos, estenopos, hendiduras, rejillas, refractores de luz, y cualquier combinación de los mismos. El detector puede incluir uno o más componentes de ajuste óptico según sea necesario, tales como dos o más, tales como tres o más, tales como cuatro o más, e incluyendo cinco o más componentes de ajuste óptico. En determinadas realizaciones, el detector incluye una lente de enfoque. La lente de enfoque, por ejemplo, puede ser una lente de demagnificación. En otros casos, la lente de enfoque es una lente de aumento. En otras realizaciones, el detector incluye un colimador.

En determinadas realizaciones, los sistemas incluyen una combinación de diferentes componentes de ajuste óptico, tales como una combinación de estenopos, lentes, espejos, hendiduras, etc. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los sistemas incluyen una lente de enfoque y una lente de colimación. En otras realizaciones, los sistemas incluyen un espejo de colimación y una lente de enfoque. En otras realizaciones más, los sistemas incluyen una lente de enfoque y una estructura de estenopos. En otras realizaciones más, los sistemas incluyen una lente de colimación y una estructura de estenopos. En otras realizaciones más, los sistemas incluyen una lente de colimación y una estructura de hendidura.

En algunas realizaciones, el detector y el componente de ajuste óptico están en comunicación óptica, pero no están físicamente en contacto. Dependiendo del tamaño del detector, el componente de ajuste óptico puede colocarse a 0,05 mm o más del detector, a 0,1 mm o más, tal como a 0,5 mm o más, tal como a 1 mm o más, tal como a 10 mm o más, tal como a 25 mm o más, tal como a 50 mm o más, tal como a 100 mm o más, tal como a 250 mm o más, incluyendo 500 mm o más. En otras realizaciones, el componente de ajuste óptico está físicamente acoplado al detector, tal como con un adhesivo, moldeado conjuntamente o integrado conjuntamente en una carcasa que tiene el componente de ajuste óptico colocado adyacente al detector. Como tal, el componente de ajuste óptico y el detector pueden integrarse en una sola unidad.

En algunas realizaciones, el componente de ajuste óptico es una lente de enfoque con una relación de aumento de desde 0,1 a 0,95, tal como una relación de aumento de desde 0,2 a 0,9, tal como una relación de aumento de desde 0,3 a 0,85, tal como una relación de aumento de desde 0,35 a 0,8, tal como una relación de aumento de desde 0,5 a 0,75, e incluyendo una relación de aumento de desde 0,55 a 0,7, por ejemplo, una relación de aumento de 0,6. Por ejemplo, la lente de enfoque es, en ciertos casos, una lente acromática doble de demagnificación con una relación de aumento de aproximadamente 0,6. Dependiendo de la distancia entre el detector y la lente, el área superficial de la superficie activa del detector, la longitud focal de la lente de enfoque puede variar, variando de 5 mm a 20 mm, tal como de 6 mm a 19 mm, tal como de 7 mm a 18 mm, tal como de 8 mm a 17 mm, tal como de 9 mm a 16, e incluyendo una longitud focal que varía de 10 mm a 15 mm. En determinadas realizaciones, la lente de enfoque tiene una longitud focal de aproximadamente 13 mm.

En determinadas realizaciones, los componentes de ajuste óptico incluyen una o más fibras ópticas que se configuran para retransmitir luz desde la cámara de boquilla de celda de flujo al detector. La fibra óptica adecuada para propagar luz desde la boquilla de celda de flujo a la superficie activa del detector incluye, pero sin limitarse a, sistemas de fibra óptica de citómetro de flujo, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos núm. US-6.809.804.

En otras realizaciones, los detectores de interés se acoplan a un colimador. El colimador puede ser cualquier protocolo de colimación conveniente, tal como uno o más espejos o lentes curvas, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, el colimador es, en ciertos casos, una única lente de colimación. En otros casos, el colimador es un espejo de colimación. En aún otros casos, el colimador incluye una serie de dos o más lentes, tal como tres o más lentes, e incluyendo cuatro o más lentes. En otros casos más, el colimador incluye un espejo y una lente. Cuando el colimador incluye una o más lentes, la longitud focal de la lente de colimación puede variar, variando de 5 mm a 40 mm, tal como de 6 mm a 37,5 mm, tal como de 7 mm a 35 mm, tal como de 8 mm a 32,5 mm, tal como de 9 mm a 30 mm, tal como de 10 mm a 27,5 mm, tal como de 12,5 mm a 25 mm, e incluyendo una longitud focal que varía de 15 mm a 20 mm.

En determinadas realizaciones, el componente de ajuste óptico es un separador de longitud de onda. Como se explicó anteriormente, los separadores de longitud de onda de interés se refieren a un protocolo óptico para separar la luz policromática en sus longitudes de onda componentes para su detección. La separación de longitud de onda, según ciertas realizaciones, puede incluir hacer pasar o bloquear selectivamente longitudes de onda específicas o intervalos de longitud de onda de la luz policromática. Para separar longitudes de onda de luz, la luz emitida por una muestra en la corriente de flujo puede pasar a través de cualquier protocolo de separación de longitud de onda conveniente, que incluye, pero sin limitarse a, vidrio coloreado, filtros de paso de banda, filtros de interferencia, espejos dicróicos, rejillas de difracción, monocromadores y combinaciones de los mismos, entre otros protocolos de separación de longitud de onda. Los sistemas pueden incluir uno o más separadores de longitud de onda, tales como dos o más, tales como tres o más, tales como cuatro o más, tales como cinco o más, e incluyendo 10 o más separadores de longitud de onda. En un ejemplo, los detectores incluyen un filtro de paso de banda. En otro ejemplo, los detectores incluyen dos o más

filtros de paso de banda. En otro ejemplo, los detectores incluyen dos o más filtros de paso de banda y una rejilla de difracción. En otro ejemplo más, los detectores incluyen un monocromador. En determinadas realizaciones, los detectores incluyen una pluralidad de filtros de paso de banda y rejillas de difracción configuradas en una configuración de rueda de filtro. Cuando los detectores incluyen dos o más separadores de longitud de onda, los separadores de longitud de onda pueden utilizarse individualmente o en serie, para separar la luz policromática en longitudes de onda componentes. En algunas realizaciones, los separadores de longitud de onda se disponen en serie. En otras realizaciones, los separadores de longitud de onda se disponen individualmente de manera que una o más mediciones se lleven a cabo mediante el uso de cada uno de los separadores de longitud de onda.

En algunas realizaciones, los detectores incluyen uno o más filtros ópticos, tales como uno o más filtros de paso de banda. Por ejemplo, los filtros ópticos de interés pueden incluir filtros de paso de banda con anchos de banda mínimos que varían de 2 nm a 100 nm, tal como de 3 nm a 95 nm, tal como de 5 nm a 95 nm, tal como de 10 nm a 90 nm, tal como de 12 nm a 85 nm, tal como de 15 nm a 80 nm, e incluyendo filtros de paso de banda que tengan anchos de banda mínimos que varíen de 20 nm a 50 nm. En otras realizaciones, el separador de longitud de onda es una rejilla de difracción. Las rejillas de difracción pueden incluir, pero sin limitarse a, rejillas de difracción de transmisión, dispersivas o reflectantes. Las separaciones adecuadas de la rejilla de difracción pueden variar dependiendo de la configuración de la cámara de boquilla de flujo, el detector y otros protocolos de ajuste óptico presentes (p. ej., lente de enfoque), variando de 0,01 μ m a 10 μ m, tal como de 0,025 μ m a 7,5 μ m, tal como de 0,5 μ m a 5 μ m, tal como de 0,75 μ m a 4 μ m, tal como de 1 μ m a 3,5 μ m, e incluyendo de 1,5 μ m a 3,5 μ m.

En determinadas realizaciones, los sistemas objeto son sistemas de citometría de flujo que emplean las boquillas de celda de flujo y subsistemas ópticos descritos anteriormente para detectar la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo por reflexión interna total. Por ejemplo, el citómetro de flujo puede configurarse para incluir una boquilla de celda de flujo que se configura para propagar la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo corriente arriba a través del orificio de boquilla por reflexión interna total. Los sistemas y métodos de citometría de flujo adecuados para analizar muestras incluyen, pero sin limitarse a, los descritos en Ormerod (ed.), *Flow Cytometry: A Practical Approach*, Oxford Univ. Pulse (1997); Jaroszeski y col. (eds.), *Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology* No. 91, Conferencia Humana (1997); *Practical Flow Cytometry*, 3ª ed., Wiley-Liss (1995); Virgo, y col. (2012) *Ann Clin Biochem. Ene*;49(pt 1):17-28; Linden, y col., *Semin Throm Hemost.* octubre de 2004;30(5):502-11; Allison, y col. *J Pathol*, diciembre de 2010; 222(4):335-344; y Herbig, y col. (2007) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 24(3):203-255. En determinados casos, los sistemas de citometría de flujo de interés incluyen el citómetro de flujo BD Biosciences FACSCanto™, los sistemas BD Biosciences FACSVantage™, BD Biosciences FACSort™, BD Biosciences FACSCount™, BD Biosciences FACScan™ y BD Biosciences FACSCalibur™, un clasificador celular BD Biosciences Influx™, o similares.

En determinadas realizaciones, los sistemas objeto son sistemas de citometría de flujo, tales como los descritos en las patentes de EE. UU. Núms. US-3.960.449; US-4.347.935; US-4.667.830; US-5.245.318; US-5.464.581; US-5.483.469; US-5.602.039; US-5.643.796; y US-5.700.692.

En algunas realizaciones, los sistemas proporcionados por la presente descripción se configuran para la recogida de luz de una muestra en un citómetro de flujo que incluye un sistema de lentes dispuesto en o por encima de una carcasa de boquilla, por lo que un canal de flujo se configura para fluir desde la boquilla hasta una zona de interrogación, y el sistema de lentes recoge la luz desde arriba del canal de flujo. El sistema incluye una fuente de irradiación configurada para dirigir un haz de luz de sondeo en el canal de flujo en una zona de interrogación. El sistema de lentes conectado operativamente a la boquilla se configura para recoger la luz emitida desde el orificio de boquilla sin interrumpir el canal de flujo. Este sistema proporciona ventajosamente una captación de luz mejorada, al tiempo que proporciona simultáneamente una recogida precisa de muestras en el canal de flujo.

Un objetivo de la citometría de flujo es determinar la cantidad de luz que se emite por partículas fluorescentes en una muestra que se suspenden en solución acuosa. Las partículas emiten luz en todas las direcciones. En los sistemas de chorro de aire, se puede transportar un canal de partículas dentro de un canal de fluido de forma cilíndrica a través de la trayectoria de una fuente de luz externa enfocada. En algunas realizaciones, las señales de luz emitidas y dispersadas desde las partículas después de pasar a través de la trayectoria de la fuente de luz enfocada son recogidas por detectores que rodean el canal de flujo. No todas las señales de luz pueden observarse desde fuera del canal de flujo. Una fracción significativa de la luz permanece atrapada dentro de la columna cilíndrica del canal de flujo a medida que el canal actúa como una guía de onda. Los rayos de luz que se acercan a la interfaz agua/aire con un ángulo que excede un ángulo crítico (denominado ángulo de reflexión interna total) se reflejan de vuelta al medio. El ángulo de TIR de la interfaz agua/aire es $\arcsin(1/1,33) = 48,7^\circ$. En consecuencia, dos conos de luz a lo largo del eje del canal de flujo, uno encima y uno debajo de la partícula emisora de luz, quedan atrapados dentro del canal de flujo del citómetro de flujo. Para una partícula fluorescente isotrópica, la luz atrapada dentro de cada uno de los conos representa $2\pi(1 - \cos(90 - 48,7)) / 4\pi$, o 0,1244 de la emisión de fluorescencia total. Por lo tanto, aproximadamente un cuarto de las señales de luz permanece dentro del canal y no puede observarse desde el exterior.

Un aspecto de esta invención es la utilización ventajosa de la geometría de la trayectoria de fluido y el conjunto de boquilla, para permitir la recogida de la señal de luz reflejada internamente en un sistema de citómetro de flujo. El método utiliza un número mínimo de componentes ópticos y genera una cantidad mínima de interrupción al flujo de fluido del canal de flujo. En algunas realizaciones, la señal recogida por los métodos de esta invención puede utilizarse

para dirigir la clasificación celular y la recogida de células en una corriente de flujo. La recogida de la misma cantidad de luz fuera del canal de flujo requeriría un conjunto óptico sofisticado con una abertura numérica (NA) del orden de 1,0. Típicamente, los citómetros de flujo tienen sistemas de recogida de luz con una NA del orden de 0,6. El sistema de recogida por reflexión interna total (TIR) de esta invención puede recolectar aproximadamente tres veces más luz que los sistemas estándar de recogida de luz de citómetro de flujo. La recogida de luz puede interrumpir o contaminar la corriente de flujo y, por lo tanto, es incompatible con una aplicación de clasificación de células que pueda realizarse mediante el uso de los métodos de esta invención. Además, el método de la presente invención puede proporcionar el aumento de la recogida de luz de una corriente de flujo con respecto a un sistema de recogida “en flujo”, porque la luz puede recogerse de toda la corriente de flujo, en lugar de una fracción de la corriente de flujo.

En algunas realizaciones, la luz atrapada dentro de un canal de flujo rebota por la superficie del canal hasta que pasa a través del orificio de la boquilla a la cámara de boquilla. Gran parte de la luz que entra en la cámara se dirigirá al techo de la cámara, donde puede recogerse por un sistema de lentes. En algunas realizaciones, la forma interior de la cámara de boquilla tiene forma cónica con un ángulo con respecto a la luz entrante que excede ligeramente el ángulo de TIR, de manera que toda o la mayor parte de la luz que pasa a través del orificio de boquilla alcanzará el sistema de lentes. El ángulo interno de la cámara de fluido en la boquilla puede inclinarse en aproximadamente 135 (p. ej., de 130 a 140) grados con respecto a la dirección del canal de flujo, para proporcionar una cantidad máxima de recogida de luz desde el canal de flujo acuoso. Un sistema de lentes puede comprender una única lente montada en el techo de la cámara para redirigir luz sobre un sistema de detección de luz (p. ej., cámara CCD). En algunas realizaciones, se puede recoger sustancialmente toda la luz atrapada dentro del canal de flujo del citómetro que se dirige hacia la punta de la boquilla.

La mayoría de los tintes fluorescentes, cuando reciben y emiten luz en un solo evento aislado, mostrarán emisión anisotrópica. La intensidad de emisión en el plano del dipolo de excitación/relajación es mucho mayor que en un plano perpendicular al mismo. Determinadas células marcadas con fluorescencia (p. ej., gametos) emiten fluorescencia heterogéneamente como resultado de su forma irregular, realizando a menudo una orientación celular dependiente de las mediciones de fluorescencia. Como resultado, la intensidad de fluorescencia que se mide depende del ángulo de observación con respecto al plano de polarización de la fuente de excitación. Al seleccionar juiciosamente el plano de polarización de la fuente de excitación, la cantidad de luz que se emite en la dirección del techo de la cámara de boquilla, se puede maximizar la intensidad de la señal. En un aspecto de esta invención, la combinación de las propiedades tipo espejo del canal de flujo y la geometría del orificio de boquilla, puede funcionar como un sistema óptico con selectividad espacial que proporcione luz de señal emitida o dispersada desde una muestra para dirigir un sistema de recogida. El canal de flujo guía la luz de señal de manera que el orificio de boquilla se irradie homogéneamente, generando una imagen agrandada con tamaño de orificio de la partícula irradiada.

En determinadas realizaciones, los sistemas de interés recogen isotrópicamente la luz emitida por una muestra en el canal de flujo. El término “isotrópico” se utiliza en la presente memoria en su sentido convencional para significar uniforme en todas las direcciones, de manera que la luz emitida por una muestra en el canal de flujo se recoja uniformemente en todas las direcciones. En las realizaciones, la recogida de luz por sistemas de interés es independiente de la orientación de las células, de la forma y la polarización de la luz emitida desde la muestra. Por consiguiente, la luz polarizada de forma heterogénea o la luz polarizada plana se puede recoger con los sistemas objeto sin ninguna óptica de ajuste adicional (p. ej., polarizadores, espejos). Por ejemplo, la combinación del canal de flujo/orificio de boquilla realiza las funciones de un sistema de lentes externo complejo. Además, el sistema puede no requerir ninguna alineación. A medida que las señales de las partículas atraviesan la abertura de boquilla, la imagen de la abertura de boquilla se proyecta como una lente fija en el sistema de detección de luz. La invención proporciona ventajosamente un método para recoger la luz emitida por el canal de flujo, sin el uso de ópticas finamente ajustadas, ya que el mayor contenido de N.A. del canal de flujo proporciona más luz que la recogida tradicionalmente por ópticas dirigidas perpendicularmente al canal de flujo.

Métodos para medir la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo

Aspectos de la descripción también incluyen métodos para medir la luz emitida de una muestra en una corriente de flujo. Los métodos según determinadas realizaciones incluyen medir la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo que se propaga corriente arriba a través del orificio de boquilla de celda de flujo por reflexión interna total mediante el medio de fluido de la corriente de flujo. Como se explicó anteriormente, en realizaciones de la presente descripción, los métodos incluyen medir la luz emitida por una muestra que se propaga corriente arriba a través del orificio de boquilla de celda de flujo por reflexión interna total mediante el medio de la corriente de flujo. Los métodos incluyen, en ciertos casos, irradiar la corriente de flujo con una fuente de luz en un campo de interrogación corriente abajo del orificio de la boquilla de flujo, y medir la luz que se propaga corriente arriba de vuelta a la cámara de boquilla de la celda de flujo a través del orificio de boquilla por reflexión interna total.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra biológica. El término “muestra biológica” se utiliza en su sentido convencional para referirse a un organismo completo, planta, hongos o un subconjunto de tejidos animales, células o partes componentes que puedan encontrarse en ciertos casos en la sangre, el moco, el líquido linfático, el líquido sinovial, el líquido cefalorraquídeo, la saliva, el lavado broncoalveolar, el líquido amniótico, la sangre del cordón amniótico, la orina, el fluido vaginal y el semen. Como tal, una “muestra biológica” se refiere tanto al organismo nativo como al subconjunto de sus tejidos, así como a un homogeneizado, lisado o extracto preparado a partir del organismo o un subconjunto de sus tejidos, que incluyen, pero sin limitarse a, por ejemplo, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, secciones de la piel,

tractos respiratorio, gastrointestinal, cardiovascular y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, tumores, órganos. Las muestras biológicas pueden ser cualquier tipo de tejido orgánico, incluyendo tanto tejido sano como enfermo (p. ej., canceroso, maligno, necrótico, etc.). En determinadas realizaciones, la muestra biológica es una muestra líquida, tal como sangre o derivado de la misma, p. ej., plasma, lágrimas, orina, semen, etc., donde en algunos casos la muestra es una muestra de sangre, que incluye sangre completa, tal como sangre obtenida de punción venosa o punción digital (donde la sangre puede o no combinarse con cualquier reactivo antes del ensayo, tales como conservantes, anticoagulantes, etc.).

En determinadas realizaciones, la fuente de la muestra es un “mamífero” o “de la clase Mammalia”, donde estos términos se usan ampliamente para describir organismos que están dentro de la clase Mammalia, incluyendo los órdenes carnívoros (p. ej., perros y gatos), roedores (p. ej., ratones, cobayas y ratas), y primates (p. ej., seres humanos, chimpancés y monos). En algunos casos, los sujetos son seres humanos. Los métodos pueden aplicarse a muestras obtenidas de sujetos humanos de ambos géneros y en cualquier etapa de desarrollo (es decir, neonatos, lactantes, juveniles, adolescentes, adultos), donde en determinadas realizaciones el sujeto humano es un juvenil, adolescente o adulto. Si bien la presente invención se puede aplicar a muestras de un sujeto humano, debe entenderse que los métodos también pueden realizarse en muestras de otros sujetos animales (es decir, en “sujetos no humanos”), tales como, pero sin limitarse a, aves, ratones, ratas, perros, gatos, ganado y caballos.

En las realizaciones, la cantidad de muestra inyectada en la boquilla de la celda de flujo a través del puerto de inyección de muestra puede variar, por ejemplo, variando de 0,01 μL a 1000 μL , tal como de 0,05 μL a 900 μL , tal como de 0,1 μL a 800 μL , tal como de 0,5 μL a 700 μL , tal como de 1 μL a 600 μL , tal como de 2,5 μL a 500 μL , tal como de 5 μL a 400 μL , tal como de 7,5 μL a 300 μL , e incluyendo de 10 μL a 200 μL de muestra.

En la práctica de los métodos según determinadas realizaciones, se irradia una muestra en una corriente de flujo en uno o más campos de interrogación con luz por una fuente de luz. Dependiendo de las propiedades de la corriente de flujo que se interroga, se pueden irradiar 0,001 mm o más de la corriente de flujo con luz, tal como 0,005 mm o más, tal como 0,01 mm o más, tal como 0,05 mm o más, tal como 0,1 mm o más, tal como 0,5 mm o más, e incluyendo 1 mm o más de la corriente de flujo se puede irradiar con luz. En determinadas realizaciones, los métodos incluyen irradiar una sección transversal plana de la corriente de flujo, tal como con un láser (como se describió anteriormente). En otras realizaciones, los métodos incluyen irradiar una longitud predeterminada de la corriente de flujo, tal como corresponde al perfil de irradiación de un rayo láser difuso o una lámpara.

En determinadas realizaciones, los métodos incluyen irradiar la corriente de flujo en o cerca de la abertura de boquilla de celda de flujo. Por ejemplo, los métodos pueden incluir irradiar la corriente de flujo en una posición de aproximadamente 0,001 mm o más desde el orificio de boquilla, tal como de 0,005 mm o más, tal como de 0,01 mm o más, tal como de 0,05 mm o más, tal como de 0,1 mm o más, tal como de 0,5 mm o más, e incluyendo 1 mm o más desde el orificio de boquilla. En determinadas realizaciones, los métodos incluyen irradiar la corriente de flujo inmediatamente adyacente a la abertura de boquilla de celda de flujo.

En algunas realizaciones, la corriente de flujo se irradia en o cerca del punto de ruptura de la corriente de flujo. Como se explicó anteriormente, el punto de ruptura se refiere al punto en la corriente de flujo en el que la corriente de flujo continuo comienza a formar gotas. En estas realizaciones, los métodos incluyen irradiar la corriente de flujo aproximadamente 0,001 mm o más desde el punto de ruptura de la corriente de flujo, tal como a 0,005 mm o más, tal como a 0,01 mm o más, tal como a 0,05 mm o más, tal como a 0,1 mm o más, tal como a 0,5 mm o más, e incluyendo 1 mm o más desde el punto de rotura de la corriente de flujo.

Al irradiar la corriente de flujo, el campo de interrogación se irradia con una o más fuentes de luz. En algunas realizaciones, la fuente de luz es una fuente de luz de banda ancha, que emite luz con una amplia gama de longitudes de onda, tal como, por ejemplo, que abarca 50 nm o más, tal como 100 nm o más, tal como 150 nm o más, tal como 200 nm o más, tal como 250 nm o más, tal como 300 nm o más, tal como 350 nm o más, tal como 400 nm o más, e incluyendo abarcar 500 nm o más. Por ejemplo, una fuente de luz de banda ancha adecuada emite luz con longitudes de onda de 200 nm a 1500 nm. Otro ejemplo de una fuente de luz de banda ancha adecuada incluye una fuente de luz que emite luz con longitudes de onda de 400 nm a 1000 nm. Cuando los métodos incluyen irradiar la corriente de flujo con una fuente de luz de banda ancha, los protocolos de fuente de luz de banda ancha de interés pueden incluir, pero sin limitarse a, una lámpara de halógeno, lámpara de arco de deuterio, lámpara de arco de xenón, fuente de luz de banda ancha acoplada con fibra estabilizada, un LED de banda ancha con espectro continuo, un diodo emisor superluminiscente, un diodo emisor de luz semiconductor, una fuente de luz blanca LED de amplio espectro, una fuente de luz blanca integrada multiLED, entre otras fuentes de luz de banda ancha, o cualquier combinación de las mismas.

En otras realizaciones, irradiar la corriente de flujo incluye irradiar con una fuente de luz de banda estrecha que emite una longitud de onda particular o un intervalo estrecho de longitudes de onda, tal como, por ejemplo, con una fuente de luz que emite luz en un intervalo estrecho de longitudes de onda como un intervalo de 50 nm o menos, tal como 40 nm o menos, tal como 30 nm o menos, tal como 25 nm o menos, tal como 20 nm o menos, tal como 15 nm o menos, tal como 10 nm o menos, tal como 5 nm o menos, tal como 2 nm o menos, e incluyendo fuentes de luz que emiten una longitud de onda específica de luz (es decir, luz monocromática). Cuando los métodos incluyen irradiar la corriente de flujo con una fuente de luz de banda estrecha, los protocolos de fuente de luz de banda estrecha de interés pueden incluir, pero

sin limitarse a, un LED de longitud de onda estrecha, un diodo láser o una fuente de luz de banda ancha acoplada a uno o más filtros de paso de banda ópticos, rejillas de difracción, monocromadores o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, los métodos incluyen irradiar la corriente de flujo con uno o más láseres. Como se explicó anteriormente, el tipo y número de láseres variarán dependiendo de la muestra, así como de la luz emitida deseada recogida y puede ser un láser de gas, tal como un láser de helio-neón, un láser de argón, un láser kriptón, un láser de xenón, un láser de nitrógeno, un láser de CO₂, un láser de CO, un láser excímero de argón-flúor (ArF), un láser excímero de kriptón-flúor (KrF), un láser excímero de cloro de xenón (XeCl), o un láser excímero de xenón (XeF), o una combinación de los mismos. En otros casos, los métodos incluyen irradiar la corriente de flujo con un láser de tinte, tal como un láser de estilbena, de cumarina o de rodamina. En otros casos más, los métodos incluyen irradiar la corriente de flujo con un láser de metal-vapor, tal como un láser de helio-cadmio (HeCd), un láser de helio-mercurio (HeHg), un láser de helio-selenio (HeSe), un láser de helio-plata (HeAg), un láser de estroncio, un láser de neón-cobre (NeCu), un láser de cobre o un láser de oro, y combinaciones de los mismos. En aún otros casos, los métodos incluyen irradiar la corriente de flujo con un láser de estado sólido, tal como un láser de rubí, un láser Nd:YAG, un láser Nd:YLF, un láser Er:YAG, un láser Nd:YVO₄, un láser Nd:YCaO(BO₃)₃, un láser Nd:YCOB, un láser de zafiro de titanio, un láser tulio YAG, un láser de iterbio YAG, un láser de iterbio₂O₃, o láseres dopados con cerio, y combinaciones de los mismos.

La muestra en la corriente de flujo puede irradiarse con una o más de las fuentes de luz mencionadas anteriormente, tales como dos o más fuentes de luz, tales como tres o más fuentes de luz, tales como cuatro o más fuentes de luz, tales como cinco o más fuentes de luz, e incluyendo diez o más fuentes de luz. La fuente de luz puede incluir cualquier combinación de tipos de fuentes de luz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos incluyen irradiar la muestra en la corriente de flujo con una matriz de láseres, tal como una matriz que tenga uno o más láseres de gas, uno o más láseres de tinte, y uno o más láseres de estado sólido.

La corriente de flujo puede irradiarse con longitudes de onda que varían de 200 nm a 1500 nm, tal como de 250 nm a 1250 nm, tal como de 300 nm a 1000 nm, tal como de 350 nm a 900 nm, e incluyendo de 400 nm a 800 nm. Por ejemplo, cuando la fuente de luz es una fuente de luz de banda ancha, la corriente de flujo puede irradiarse con longitudes de onda de 200 nm a 900 nm. En otros casos, donde la fuente de luz incluye una pluralidad de fuentes de luz de banda estrecha, la corriente de flujo puede irradiarse con longitudes de onda específicas en el intervalo de 200 nm a 900 nm. Por ejemplo, la fuente de luz puede ser una pluralidad de LED de banda estrecha (1 nm-25 nm) que cada uno emite de forma independiente luz con un intervalo de longitudes de onda entre 200 nm a 900 nm. En otras realizaciones, la fuente de luz de banda estrecha incluye uno o más láseres (tales como una matriz láser), y la corriente de flujo se irradia con longitudes de onda específicas que varían de 200 nm a 700 nm, tal como con una matriz láser que tiene láseres de gas, láseres excímero, láseres de tinte, láseres de vapor de metal, y láser de estado sólido como se describió anteriormente.

Cuando se emplea más de una fuente de luz, la corriente de flujo puede irradiarse con las fuentes de luz de forma simultánea o secuencial, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, la corriente de flujo puede irradiarse simultáneamente con ambas fuentes de luz. En otras realizaciones, la corriente de flujo se irradia secuencialmente con ambas fuentes de luz. Cuando dos fuentes de luz irradian secuencialmente, el tiempo que cada fuente de luz irradia la muestra en la corriente de flujo puede ser independientemente 0,001 microsegundos o más, tal como 0,01 microsegundos o más, tal como 0,1 microsegundos o más, tal como 1 microsegundo o más, tal como 5 microsegundos o más, tal como 10 microsegundos o más, tal como 30 microsegundos o más, e incluyendo 60 microsegundos o más. Por ejemplo, los métodos pueden incluir irradiar la corriente de flujo con la fuente de luz (p. ej., láser) durante una duración que varía de 0,001 microsegundos a 100 microsegundos, tal como de 0,01 microsegundos a 75 microsegundos, tal como de 0,1 microsegundos a 50 microsegundos, tal como de 1 microsegundo a 25 microsegundos, e incluyendo de 5 microsegundos a 10 microsegundos. En realizaciones en las que la corriente de flujo se irradia secuencialmente con dos o más fuentes de luz, la duración de la corriente de flujo que se irradia por cada fuente de luz puede ser igual o diferente.

El período de tiempo entre la irradiación de la corriente de flujo en el campo de interrogación por cada fuente de luz también puede variar, según se desee, separado independientemente por un retardo de 0,001 microsegundos o más, tal como 0,01 microsegundos o más, tal como 0,1 microsegundos o más, tal como 1 microsegundo o más, tal como 5 microsegundos o más, tal como de 10 microsegundos o más, tal como de 15 microsegundos o más, tal como de 30 microsegundos o más, e incluyendo de 60 microsegundos o más. Por ejemplo, el período de tiempo entre la irradiación de la corriente de flujo en el campo de interrogación por cada fuente de luz puede variar de 0,001 microsegundos a 60 microsegundos, tal como de 0,01 microsegundos a 50 microsegundos, tal como de 0,1 microsegundos a 35 microsegundos, tal como de 1 microsegundo a 25 microsegundos, e incluyendo de 5 microsegundos a 10 microsegundos. En determinadas realizaciones, el período de tiempo entre la irradiación de la corriente de flujo en el campo de interrogación por cada fuente de luz es de 10 microsegundos. En realizaciones en las que los sistemas objeto se configuran para irradiar secuencialmente la corriente de flujo por más de dos (es decir, tres o más) fuentes de luz, el retardo entre la irradiación por cada fuente de luz puede ser igual o diferente.

La corriente de flujo puede irradiarse continuamente o en intervalos discretos. En algunos casos, los métodos incluyen irradiar la muestra en la corriente de flujo con la fuente de luz de forma continua. En otros casos, la muestra en la corriente de flujo se irradia con la fuente de luz en intervalos discretos, tal como irradiar la corriente de flujo en el campo de interrogación cada 0,001 milisegundos, cada 0,01 milisegundos, cada 0,1 milisegundos, cada 1 milisegundo, cada 10 milisegundos, cada 100 milisegundos, e incluyendo cada 1000 milisegundos, o algún otro intervalo.

Dependiendo de la fuente de luz y de las características de la corriente de flujo (p. ej., la anchura de la corriente de flujo), la corriente de flujo puede irradiarse desde una distancia que varía tal como 0,01 mm o más de la corriente de flujo, tal como 0,05 mm o más, tal como 0,1 mm o más, tal como 0,5 mm o más, tal como 1 mm o más, tal como 2,5 mm o más, tal como 5 mm o más, tal como 10 mm o más, tal como 15 mm o más, tal como 25 mm o más, e incluyendo 50 mm o más de la corriente de flujo. Además, el ángulo en el que la corriente de flujo se irradia también puede variar, variando de 10° a 90°, tal como de 15° a 85°, tal como de 20° a 80°, tal como de 25° a 75°, e incluyendo de 30° a 60°. En determinadas realizaciones, la corriente de flujo se irradia por la fuente de luz en un ángulo de 90° con respecto al eje de la corriente de flujo.

En determinadas realizaciones, irradiar la corriente de flujo incluye desplazar una o más fuentes de luz (p. ej., láseres) a lo largo de la trayectoria de la corriente de flujo. Por ejemplo, la fuente de luz puede desplazarse corriente arriba o corriente abajo junto con la corriente de flujo, irradiando la corriente de flujo a lo largo de una longitud predeterminada de la corriente de flujo. Por ejemplo, los métodos pueden incluir desplazar la fuente de luz a lo largo de la corriente de flujo a 0,01 mm o más de la corriente de flujo, tal como a 0,05 mm o más, tal como a 0,1 mm o más, tal como a 0,5 mm o más, tal como a 1 mm o más, tal como a 2,5 mm o más, tal como a 5 mm o más, tal como a 10 mm o más, tal como a 15 mm o más, tal como a 25 mm o más, e incluyendo 50 mm o más de la corriente de flujo. La fuente de luz puede desplazarse continuamente o en intervalos discretos. En algunas realizaciones, la fuente de luz se desplaza continuamente. En otras realizaciones, la fuente de luz se desplaza a lo largo de la trayectoria de la corriente de flujo en intervalos discretos, tal como, por ejemplo, en incrementos de 0,1 mm o más, tal como en incrementos de 0,25 mm o más, e incluyendo en incrementos de 1 mm o más.

Como se explicó anteriormente, en realizaciones de la presente descripción, los métodos incluyen medir la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo que se propaga corriente arriba por la reflexión interna total por el medio de la corriente de flujo. Los métodos incluyen, en ciertos casos, irradiar la corriente de flujo con una fuente de luz en un campo de interrogación corriente abajo del orificio de la boquilla de flujo, y medir la luz que se propaga corriente arriba de vuelta a la cámara de boquilla de la celda de flujo a través del orificio de boquilla por reflexión interna total.

En realizaciones, los métodos incluyen medir la luz emitida propagada corriente arriba de la muestra en la corriente de flujo hacia la cámara de boquilla de celda de flujo a través del orificio de boquilla. En la práctica de métodos según aspectos de la presente descripción, la luz emitida propagada a través del orificio de boquilla de la celda de flujo se mide en una o más longitudes de onda, tal como en 5 o más longitudes de onda diferentes, tal como en 10 o más longitudes de onda diferentes, tal como en 25 o más longitudes de onda diferentes, tal como en 50 o más longitudes de onda diferentes, tal como en 100 o más longitudes de onda diferentes, tal como en 200 o más longitudes de onda diferentes, tal como en 300 o más longitudes de onda diferentes, e incluyendo medir la luz transmitida a través de la cámara de muestra en 400 o más longitudes de onda diferentes.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen medir la luz emitida por una muestra en la corriente de flujo en un intervalo de longitudes de onda (p. ej., 200 nm-1000 nm). En determinadas realizaciones, medir la luz emitida propagada corriente arriba a través del orificio de boquilla por reflexión interna total, incluye recoger espectros de luz en un intervalo de longitudes de onda. Por ejemplo, los métodos pueden incluir recoger espectros de luz en uno o más de los intervalos de longitud de onda de 200 nm-1000 nm. En otras realizaciones más, los métodos incluyen medir la luz emitida propagada corriente arriba a través del orificio de boquilla incluye en una o más longitudes de onda específicas. Por ejemplo, la luz emitida puede medirse a uno o más de 450 nm, 518 nm, 519 nm, 561 nm, 578 nm, 605 nm, 607 nm, 625 nm, 650 nm, 660 nm, 667 nm, 670 nm, 668 nm, 695 nm, 710 nm, 723 nm, 780 nm, 785 nm, 647 nm, 617 nm, y cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, los métodos que incluyen medir longitudes de onda de luz que corresponden a la longitud de onda máxima de fluorescencia de determinados fluoróforos.

La luz emitida puede medirse continuamente o en intervalos discretos. En algunos casos, los métodos incluyen realizar mediciones de la luz emitida por una muestra en la corriente de flujo continuamente. En otros casos, la luz emitida se mide en intervalos discretos, tal como medir la luz cada 0,001 milisegundos, cada 0,01 milisegundos, cada 0,1 milisegundos, cada 1 milisegundo, cada 10 milisegundos, cada 100 milisegundos, e incluyendo cada 1000 milisegundos, o algún otro intervalo.

Las mediciones de la luz emitida pueden realizarse una o más veces durante los métodos objeto, tales 2 o más veces, tal como 3 o más veces, tal como 5 o más veces, e incluyendo 10 o más veces. En determinadas realizaciones, la luz emitida propagada corriente arriba a través del orificio de boquilla por reflexión interna total, se mide dos o más veces, promediándose los datos en determinados casos.

La luz emitida propagada corriente arriba a través del orificio de boquilla por reflexión interna total puede medirse mediante cualquier protocolo de detección de luz conveniente, incluyendo, pero sin limitarse a, sensores ópticos o fotodetectores, tales como sensores de píxeles activos (APS), fotodiodos de avalancha, sensores de imagen, dispositivos de carga acoplada (CCD), dispositivos de carga acoplada intensificada (ICCD), diodos emisores de luz, contadores de fotones, bolómetros, detectores piroeléctricos, fotorresistores, células fotovoltaicas, fotodiodos, tubos fotomultiplicadores, fototransistores, fotoconductores o fotodiodos de puntos cuánticos, y combinaciones de los mismos, entre otros fotodetectores. En determinadas realizaciones, la luz transmitida se mide con un dispositivo de carga acoplada (CCD), dispositivos de carga acoplada de semiconductores (CCD), sensores de píxeles activos (APS), sensores de imagen complementarios de semiconductores de óxido metálico (CMOS), o sensores de imagen de semiconductores de óxido metálico de tipo N (NMOS). En ciertas realizaciones, la luz se mide con un dispositivo de

carga acoplada (CCD). Cuando la luz transmitida se mide con un CCD, el área superficial de detección activa del CCD puede variar, tal como desde 0,01 cm² a 10 cm², tal como desde 0,05 cm² a 9 cm², tal como desde, tal como desde 0,1 cm² a 8 cm², tal como desde 0,5 cm² a 7 cm², e incluyendo desde 1 cm² a 5 cm².

En algunas realizaciones, los métodos incluyen ajustar ópticamente la luz emitida propagada a través del orificio de boquilla de celda de flujo. Por ejemplo, la luz emitida puede pasar a través de una o más lentes, espejos, estenopos, hendiduras, rejillas, refractores de luz, y cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, la luz emitida se pasa a través de una o más lentes de enfoque, para reducir el perfil de la luz propagada a través del orificio de boquilla de celda de flujo sobre la superficie activa del detector. En otros casos, la luz emitida se pasa a través de una o más lentes de demagnificación, para aumentar el perfil de la luz propagada a través del orificio de boquilla de celda de flujo sobre la superficie activa del detector.

En aún otros casos, los métodos incluyen colimar la luz. Por ejemplo, la luz propagada corriente arriba a través del orificio de boquilla desde la corriente de flujo, puede colimarse pasando la luz a través de una o más lentes de colimación o espejos de colimación o una combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, los métodos incluyen pasar la luz recogida del orificio de boquilla a través de la fibra óptica. Como se explicó anteriormente, los protocolos de fibra óptica adecuados para la luz propagada procedente de la cámara de boquilla de celda de flujo a la superficie activa del detector, incluyen, pero sin limitarse a, protocolos de fibra óptica de citómetro de flujo, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos núm. US-6.809.804.

En determinadas realizaciones, los métodos incluyen el paso de la luz emitida que se propaga a través del orificio de la boquilla por la reflexión interna total a través de uno o más separadores de longitud de onda. La separación de longitud de onda, según ciertas realizaciones, puede incluir hacer pasar o bloquear selectivamente longitudes de onda específicas o intervalos de longitud de onda de la luz policromática. Para separar longitudes de onda de luz, la luz puede pasar a través de cualquier protocolo de separación de longitud de onda conveniente, que incluye, pero sin limitarse a, vidrio coloreado, filtros de paso de banda, filtros de interferencia, espejos dicróicos, rejillas de difracción, monocromadores y combinaciones de los mismos, entre otros protocolos de separación de longitud de onda.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen separar la luz pasando la luz a través de una o más rejillas de difracción. Las rejillas de difracción de interés pueden incluir, pero sin limitarse a, rejillas de difracción de transmisión, dispersivas o reflectantes. Las separaciones adecuadas de la rejilla de difracción pueden variar dependiendo de la configuración de la fuente de luz, el módulo de proyección de hendidura, la cámara de muestra, la lente objetivo, variando de 0,01 µm a 10 µm, tal como de 0,025 µm a 7,5 µm, tal como de 0,5 µm a 5 µm, tal como de 0,75 µm a 4 µm, tal como de 1 µm a 3,5 µm, e incluyendo de 1,5 µm a 3,5 µm.

En otras realizaciones, los métodos incluyen separar las longitudes de onda de la luz haciendo pasar la luz emitida que se propaga a través del orificio de boquilla mediante la reflexión interna total a través de uno o más filtros ópticos, tal como uno o más filtros de paso de banda. Por ejemplo, los filtros ópticos de interés pueden incluir filtros de paso de banda con anchos de banda mínimos que varían de 2 nm a 100 nm, tal como de 3 nm a 95 nm, tal como de 5 nm a 95 nm, tal como de 10 nm a 90 nm, tal como de 12 nm a 85 nm, tal como de 15 nm a 80 nm, e incluyendo filtros de paso de banda que tengan anchos de banda mínimos que varíen de 20 nm a 50 nm.

Sistemas controlados por ordenador

Los aspectos de la presente descripción incluyen, además, sistemas controlados por ordenador para practicar los métodos objeto, donde los sistemas incluyen, además, uno o más ordenadores para automatización completa o automatización parcial de un sistema para practicar los métodos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, los sistemas incluyen un ordenador que tiene un medio de almacenamiento legible por ordenador con un programa informático almacenado en el mismo, donde el programa informático, cuando se carga en el ordenador, incluye instrucciones para irradiar una muestra en una corriente de flujo en un campo de interrogación; un algoritmo para detectar la luz emitida propagada corriente arriba a través del orificio de boquilla de celda de flujo mediante reflexión interna total, y medir la luz detectada en una o más longitudes de onda.

En realizaciones, el sistema incluye un módulo de entrada, un módulo de procesamiento y un módulo de salida. En algunas realizaciones, los sistemas objeto pueden incluir un módulo de entrada de modo que los parámetros o información sobre cada muestra fluidica, intensidad y longitudes de onda (discretas o intervalos) de la fuente de luz aplicada, las propiedades de la boquilla de celda de flujo, incluyendo el tamaño de la cámara de boquilla, los ángulos hechos por las paredes de la cámara de boquilla con respecto al eje de la corriente de flujo, el tamaño del orificio de boquilla y el espesor de la pared en el orificio de la boquilla, la duración de la irradiación por la fuente de luz, el número de diferentes fuentes de luz, la distancia de la fuente de luz a la corriente de flujo, la longitud focal de cualquier componente de ajuste óptico, el índice de refracción del medio de la corriente de flujo (p. ej., fluido envolvente), la presencia de cualquier separador de longitudes de onda, las propiedades de los separadores de longitud de onda, incluyendo la anchura de paso de banda, la opacidad, la separación de la rejilla, así como las propiedades y la sensibilidad de los fotodetectores.

El módulo de procesamiento incluye memoria que tiene una pluralidad de instrucciones para realizar las etapas de los métodos objeto, tales como irradiar una muestra en una corriente de flujo en un campo de interrogación; detectar

la luz emitida por la muestra en la corriente de flujo propagada corriente arriba a través del orificio de boquilla de celda de flujo mediante reflexión interna total, y medir la luz detectada en una o más longitudes de onda.

Después de que el módulo de procesamiento realice una o más de las etapas de los métodos objeto, un módulo de salida comunica los resultados al usuario, tal como visualizándolos en un monitor o imprimiendo un informe.

Los sistemas objeto pueden incluir tanto componentes de hardware como de software, donde los componentes de hardware pueden ser en forma de una o más plataformas, p. ej., en forma de servidores, de manera que los elementos funcionales, es decir, aquellos elementos del sistema que realizan tareas específicas (tales como la gestión de entrada y salida de información, procesar información, etc.) del sistema, pueden realizarse mediante la ejecución de aplicaciones informáticas en y a través de una o más plataformas informáticas representadas del sistema.

Los sistemas pueden incluir una pantalla y un dispositivo de entrada del operador. Los dispositivos de entrada del operador pueden ser, por ejemplo, un teclado, un ratón o similares. El módulo de procesamiento incluye un procesador que tiene acceso a una memoria con instrucciones almacenadas en la misma para realizar las etapas de los métodos objeto, tales como irradiar una muestra en una corriente de flujo en un campo de interrogación; detectar la luz emitida por la muestra en la corriente de flujo propagada corriente arriba a través del orificio de boquilla de celda de flujo mediante reflexión interna total, y medir la luz detectada en una o más longitudes de onda.

El módulo de procesamiento puede incluir un sistema operativo, un controlador de interfaz gráfica de usuario (GUI), una memoria de sistema, dispositivos de almacenamiento de memoria, y controladores de entrada-salida, memoria caché, una unidad de respaldo de datos, y muchos otros dispositivos. El procesador puede ser un procesador disponible comercialmente o puede ser uno de otros procesadores que están o estarán disponibles. El procesador ejecuta el sistema operativo y el sistema operativo interactúa con el firmware y el hardware de una manera bien conocida, y facilita el procesador en la coordinación y ejecución de las funciones de diversos programas informáticos que pueden escribirse en una variedad de lenguajes de programación, tales como Java, Perl, C++, otros lenguajes de alto nivel o bajo nivel, así como combinaciones de los mismos, como se conoce en la técnica. El sistema operativo, típicamente en cooperación con el procesador, coordina y ejecuta funciones de los otros componentes del ordenador. El sistema operativo también proporciona planificación, control de entrada-salida, gestión de archivos y datos, gestión de memoria, y control de comunicación y servicios relacionados, todo según técnicas conocidas.

La memoria del sistema puede ser cualquiera de una variedad de dispositivos de almacenamiento de memoria conocidos o futuros. Los ejemplos incluyen cualquier memoria de acceso aleatorio (RAM) comúnmente disponible, un medio magnético, tal como un disco duro o cinta residente, un medio óptico, tal como un disco compacto de lectura y escritura, dispositivos de memoria flash, u otro dispositivo de almacenamiento de memoria. El dispositivo de almacenamiento de memoria puede ser cualquiera de una variedad de dispositivos conocidos o futuros, que incluyen una unidad de disco compacto, una unidad de cinta, una unidad de disco duro extraíble, o una unidad de disquete. Tales tipos de dispositivos de almacenamiento de memoria típicamente leen de, y/o escriben a, un medio de almacenamiento de programas (no mostrado), tal como, respectivamente, un disco compacto, una cinta magnética, un disco duro extraíble o un disquete. Cualquiera de estos medios de almacenamiento de programas, u otros ahora en uso o que pueden desarrollarse posteriormente, pueden considerarse un producto de programa informático. Como se apreciará, estos medios de almacenamiento de programas típicamente almacenan un programa de software de ordenador y/o datos. Los programas de software informático, también llamados lógica de control informático, típicamente se almacenan en la memoria del sistema y/o en el dispositivo de almacenamiento de programas utilizado junto con el dispositivo de almacenamiento de memoria.

En algunas realizaciones, se describe un producto de programa informático que incluye un medio utilizable por ordenador que tiene almacenada lógica de control (programa informático, incluido código de programa) en el mismo. La lógica de control, cuando la ejecuta el procesador del ordenador, hace que el procesador realice las funciones descritas en la presente memoria. En otras realizaciones, algunas funciones se implementan principalmente en hardware, utilizando, por ejemplo, una máquina de estado de hardware. La implementación de la máquina de estado de hardware para realizar las funciones descritas en el presente documento, será evidente para los expertos en las técnicas relevantes.

La memoria puede ser cualquier dispositivo adecuado en donde el procesador pueda almacenar y recuperar datos, tales como dispositivos de almacenamiento magnéticos, ópticos o de estado sólido (incluidos discos magnéticos u ópticos, cintas o RAM, o cualquier otro dispositivo adecuado, ya sea fijo o portátil). El procesador puede incluir un microprocesador digital de propósito general adecuadamente programado a partir de un medio legible por ordenador que lleva el código de programa necesario. La programación se puede proporcionar de forma remota al procesador a través de un canal de comunicación, o se puede guardar previamente en un producto de programa informático, como una memoria o algún otro medio de almacenamiento portátil o fijo legible por ordenador usando cualquiera de esos dispositivos en conexión con la memoria. Por ejemplo, un disco magnético u óptico puede llevar la programación y puede ser leído por un escritor/lector de disco. Los sistemas de la invención también incluyen programación, p. ej., en forma de productos de programas informáticos, algoritmos para su uso en la práctica de los métodos descritos anteriormente. Las instrucciones y los algoritmos descritos en el presente documento pueden grabarse en cualquier medio legible por ordenador conveniente, p. ej., cualquier medio que pueda leerse y accederse directamente por un ordenador. Dichos medios incluyen, pero sin limitarse a: medios de almacenamiento magnético, como disquetes, medios de almacenamiento en discos duros y cintas

magnéticas; medios de almacenamiento óptico como CD-ROM; medios de almacenamiento eléctrico como RAM y ROM; unidad flash portátil; e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos.

5 El procesador también puede tener acceso a un canal de comunicación para comunicarse con un usuario en una ubicación remota. Por ubicación remota se entiende que el usuario no está directamente en contacto con el sistema, y transmite información de entrada a un gestor de entrada desde un dispositivo externo, tal como un ordenador conectado a una red de área amplia ("WAN"), una red telefónica, una red satelital, o cualquier otro canal de comunicación adecuado, incluyendo un teléfono móvil (es decir, teléfono inteligente).

10 En algunas realizaciones, los sistemas según la presente descripción pueden configurarse para incluir una interfaz de comunicación. En algunas realizaciones, la interfaz de comunicación incluye un receptor y/o transmisor para comunicarse con una red y/u otro dispositivo. La interfaz de comunicación se puede configurar para comunicación por cable o inalámbrica, incluyendo, pero sin limitarse a, comunicación por radiofrecuencia (RF) (p. ej., identificación por radiofrecuencia (RFID), protocolos de comunicación Zigbee, WiFi, infrarrojos, bus serie universal (USB) 15 inalámbrico, banda ultra ancha (UWB), protocolos de comunicación Bluetooth®, y comunicación celular, tal como acceso múltiple por división de código (CDMA) o el sistema global para comunicaciones móviles (GSM).

En una realización, la interfaz de comunicación se configura para incluir uno o más puertos de comunicación, p. ej., puertos o interfaces físicas, tales como un puerto USB, un puerto RS-232, o cualquier otro puerto de conexión eléctrica adecuado para permitir la comunicación de datos entre los sistemas objeto y otros dispositivos externos, 20 tales como un terminal informático (por ejemplo, en la consulta de un médico o en el entorno hospitalario) que se configure para una comunicación de datos complementaria similar.

En una realización, la interfaz de comunicación se configura para comunicación infrarroja, comunicación Bluetooth®, 25 o cualquier otro protocolo de comunicación inalámbrica adecuado para permitir que los sistemas objeto se comuniquen con otros dispositivos, tales como terminales y/o redes informáticas, teléfonos móviles habilitados para comunicación, asistentes digitales personales, o cualquier otro dispositivo de comunicación que el usuario pueda utilizar junto con el mismo, en la gestión del tratamiento de un problema de salud, tal como VIH, SIDA o anemia.

30 En una realización, la interfaz de comunicación se configura para proporcionar una conexión para la transferencia de datos utilizando el protocolo de internet (IP) a través de una red de teléfono celular, servicio de mensajes cortos (SMS), conexión inalámbrica a un ordenador personal (PC) en una red de área local (LAN) que esté conectada a internet, o conexión WiFi a internet en un punto de conexión WiFi.

35 En una realización, los sistemas objeto se configuran para comunicarse de forma inalámbrica con un dispositivo servidor a través de la interfaz de comunicación, p. ej., usando un estándar común, tal como 802.11 o el protocolo de RF Bluetooth®, o un protocolo de infrarrojos IrDA. El dispositivo servidor puede ser otro dispositivo portátil, tal como un teléfono inteligente, asistente digital personal (PDA) o un ordenador portátil; o un dispositivo mayor, tal como un ordenador de sobremesa, aparato, etc. En algunas realizaciones, el dispositivo servidor tiene una pantalla, tal como una pantalla de 40 cristal líquido (LCD), así como un dispositivo de entrada, tal como botones, un teclado, un ratón o una pantalla táctil.

En algunas realizaciones, la interfaz de comunicación se configura para comunicar automáticamente o semiautomáticamente datos almacenados en los sistemas objeto, p. ej., en una unidad de almacenamiento de datos 45 opcional, con una red o dispositivo de servidor utilizando uno o más de los protocolos y/o mecanismos de comunicación descritos anteriormente.

Los controladores de salida pueden incluir controladores para cualquiera de una variedad de dispositivos de visualización conocidos para presentar información a un usuario, ya sea una persona o una máquina, ya sea local 50 o remota. Si uno de los dispositivos de visualización proporciona información visual, esta información típicamente puede organizarse lógicamente y/o físicamente como una matriz de elementos de imagen. Un controlador de interfaz gráfica de usuario (GUI) puede incluir cualquiera de una variedad de programas informáticos conocidos o futuros para proporcionar interfaces gráficas de entrada y salida entre el sistema y un usuario, y para procesar entradas de usuario. Los elementos funcionales del ordenador pueden comunicarse entre sí a través del bus del sistema. Algunas de estas comunicaciones pueden lograrse en realizaciones alternativas mediante el uso de una red u otros 55 tipos de comunicaciones remotas. El gestor de salida también puede proporcionar información generada por el módulo de procesamiento a un usuario en una ubicación remota, p. ej., a través de Internet, teléfono o red satelital, según técnicas conocidas. La presentación de datos por el gestor de salida puede implementarse según una variedad de técnicas conocidas. Como algunos ejemplos, los datos pueden incluir documentos SQL, HTML o XML, correo electrónico u otros archivos, o datos en otras formas. Los datos pueden incluir direcciones URL de Internet para que un usuario pueda recuperar SQL, HTML, XML u otros documentos o datos adicionales de fuentes remotas. 60 La una o más plataformas presentes en los sistemas objeto pueden ser cualquier tipo de plataforma informática conocida o un tipo que se desarrolle en el futuro, aunque típicamente serán de una clase de ordenador comúnmente denominado servidores. Sin embargo, también pueden ser un ordenador central, una estación de trabajo u otro tipo de ordenador. Pueden conectarse a través de cualquier tipo conocido o futuro de cableado u otro sistema de comunicación que incluya sistemas inalámbricos, ya sea en red o de otro modo. Pueden ubicarse conjuntamente o 65 pueden estar físicamente separados. Pueden emplearse diversos sistemas operativos en cualquiera de las

plataformas informáticas, posiblemente dependiendo del tipo y/o marca de la plataforma informática elegida. Los sistemas operativos apropiados incluyen Windows NT®, Windows XP, Windows 7, Windows 8, iOS, Sun Solaris, Linux, OS/400, Compaq Tru64 Unix, SGI IRIX, Siemens Reliant Unix, y otros.

5 Kits

Los aspectos de la invención incluyen, además, kits, donde los kits incluyen una o más boquillas de celda de flujo como se describe en la presente memoria. En algunos casos, los kits pueden incluir uno o más componentes de ensayo (p. ej., reactivos marcados, tampones, etc., tal como se describió anteriormente). En algunos casos, los kits pueden incluir, además, un dispositivo de recogida de muestras, p. ej., una lanceta o aguja configurada para pinchar la piel para obtener una muestra de sangre completa, una pipeta, etc., según se desee.

Los diversos componentes de ensayo de los kits pueden encontrarse en recipientes separados, o algunos o todos ellos pueden combinarse previamente. Por ejemplo, en algunos casos, uno o más componentes del kit, p. ej., las boquillas de celda de flujo, se encuentran en una bolsa sellada, p. ej., una bolsa o sobre de aluminio estéril.

Además de los componentes anteriores, los kits objeto pueden incluir, además (en determinadas realizaciones), instrucciones para practicar los métodos objeto. Estas instrucciones pueden encontrarse en los kits objeto en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden encontrarse en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden presentarse es como información impresa sobre un medio o sustrato adecuado, p. ej., una pieza o piezas de papel sobre la que se imprima la información, en la envoltura del kit, en un prospecto, y similares. Otra forma más de estas instrucciones es un medio legible por ordenador, p. ej., un disquete, un disco compacto (CD), una unidad flash portátil, y similares, en el que se ha grabado la información. Otra forma más de estas instrucciones que pueden estar presentes es una dirección de sitio web que pueda utilizarse a través de internet para acceder a la información en un sitio eliminado.

25 Utilidad

Las boquillas, sistemas, métodos y sistemas informáticos de celdas de flujo en cuestión, encuentran uso en una variedad de aplicaciones donde se desee aumentar la cantidad de luz emitida medida por una muestra en un medio fluido. En algunas realizaciones, la presente descripción encuentra uso para mejorar las mediciones de la luz emitida por una muestra en una corriente de flujo de un citómetro de flujo. Las realizaciones de la presente descripción encuentran uso donde se desee mejorar la efectividad de las mediciones de emisión en citometría de flujo, tales como en investigación y pruebas de laboratorio de alto rendimiento. La presente descripción también encuentra uso donde sea conveniente proporcionar un citómetro de flujo con precisión mejorada de clasificación celular, recogida de partículas mejorada, consumo de energía reducido, eficiencia de carga de partículas, carga de partículas más precisa, y deflexión de partículas mejorada durante la clasificación celular. En las realizaciones, la presente descripción reduce la necesidad de aumentar el número de detectores colocados adyacentes a una celda de flujo para recoger la luz emitida difusa.

La presente descripción encuentra también uso en aplicaciones en donde pueden desearse células preparadas a partir de una muestra biológica para investigación, pruebas de laboratorio o para su uso en terapia. En algunas realizaciones, los métodos y dispositivos objeto pueden facilitar la obtención de células individuales preparadas a partir de una muestra biológica fluidica o tisular diana. Por ejemplo, los métodos y sistemas en cuestión facilitan la obtención de células a partir de muestras de fluidos o tejidos para su uso como muestra de investigación o diagnóstico para enfermedades tales como el cáncer. Asimismo, los métodos y sistemas en cuestión facilitan la obtención de células a partir de muestras fluidicas o tisulares para su uso en terapia. Los métodos y dispositivos de la presente descripción permiten separar y recoger células de una muestra biológica (por ejemplo, órgano, tejido, fragmento de tejido, fluido) con mayor eficiencia y bajo coste en comparación con los sistemas de citometría de flujo tradicionales.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, es fácilmente evidente para los expertos en la técnica, a la luz de las enseñanzas de esta descripción, que pueden realizarse determinados cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una boquilla (200a, 200b) de celda de flujo configurada para propagar una corriente de flujo que comprende una muestra en donde la boquilla (200a, 200b) de celda de flujo comprende:
5 una cámara de boquilla que tiene un extremo proximal y un extremo distal (220a, 220b); y un orificio (221a, 221b) de boquilla colocado en el extremo distal (220a, 221b) de la cámara de boquilla,
10 en donde la cámara de boquilla comprende paredes que comprenden un recubrimiento reflectante que está en un ángulo de 120° a 160° con respecto al eje longitudinal de la corriente de flujo, cuando la corriente de flujo sale del orificio (221a, 221b) de boquilla, y refleja la luz emitida por la muestra que se propaga corriente arriba con la reflexión interna total a través del flujo hasta el extremo proximal (210a, 210b) de la cámara de boquilla, cuando la corriente de flujo sale del orificio (221a, 221b) de boquilla.
15
2. La boquilla de celda de flujo según la reivindicación 1, en donde la cámara de boquilla comprende una parte (210a) cilíndrica proximal.
3. La boquilla de celda de flujo según las reivindicaciones 1 o 2, en donde la anchura de las paredes de la
20 celda de flujo en el orificio de boquilla es un cuarto o menos de la anchura de la corriente de flujo.
4. La boquilla de celda de flujo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cámara de boquilla comprende, además, un componente de ajuste óptico.
- 25 5. Un sistema para detectar luz propagada en una corriente de flujo por reflexión interna total, comprendiendo el sistema:
una fuente de luz configurada para irradiar una muestra en la corriente de flujo en un campo de interrogación;
30 una boquilla de celda de flujo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un detector para medir una o más longitudes de onda de luz propagada por la muestra en el extremo proximal de la cámara de boquilla.
- 35 6. El sistema según la reivindicación 5, en donde la fuente de luz es un láser.
7. El sistema según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde la boquilla de celda de flujo está situada ortogonal a la fuente de luz.
- 40 8. Un método para detectar luz propagada en una corriente de flujo por reflexión interna total, comprendiendo el método:
irradiar una muestra en la corriente de flujo en un campo de interrogación con una fuente de luz;
propagar la corriente de flujo con una boquilla de celda de flujo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4,
45 detectar la luz emitida por la muestra en la corriente de flujo propagada corriente arriba a través de la corriente de flujo por reflexión interna total en un extremo proximal de la cámara de boquilla, y
medir la luz detectada en una o más longitudes de onda.
- 50 9. El método según la reivindicación 8, en donde la corriente de flujo se irradia en un campo de interrogación que es ortogonal y se coloca a 1 mm o más corriente abajo del orificio de boquilla de celda de flujo.
10. El método según las reivindicaciones 8 o 9, en donde la muestra emite fluorescencia heterogéneamente.
- 55 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la muestra es un gameto.

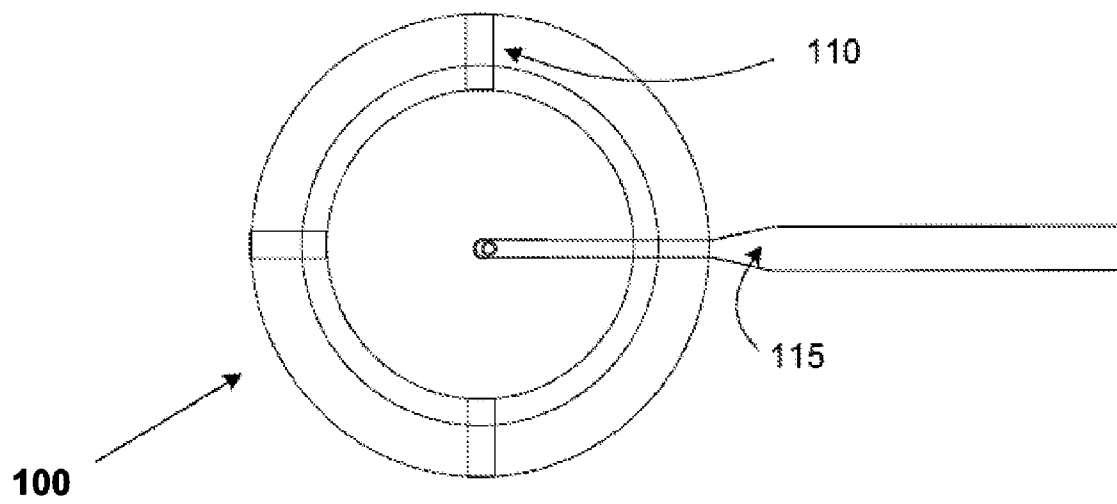


Figura 1A

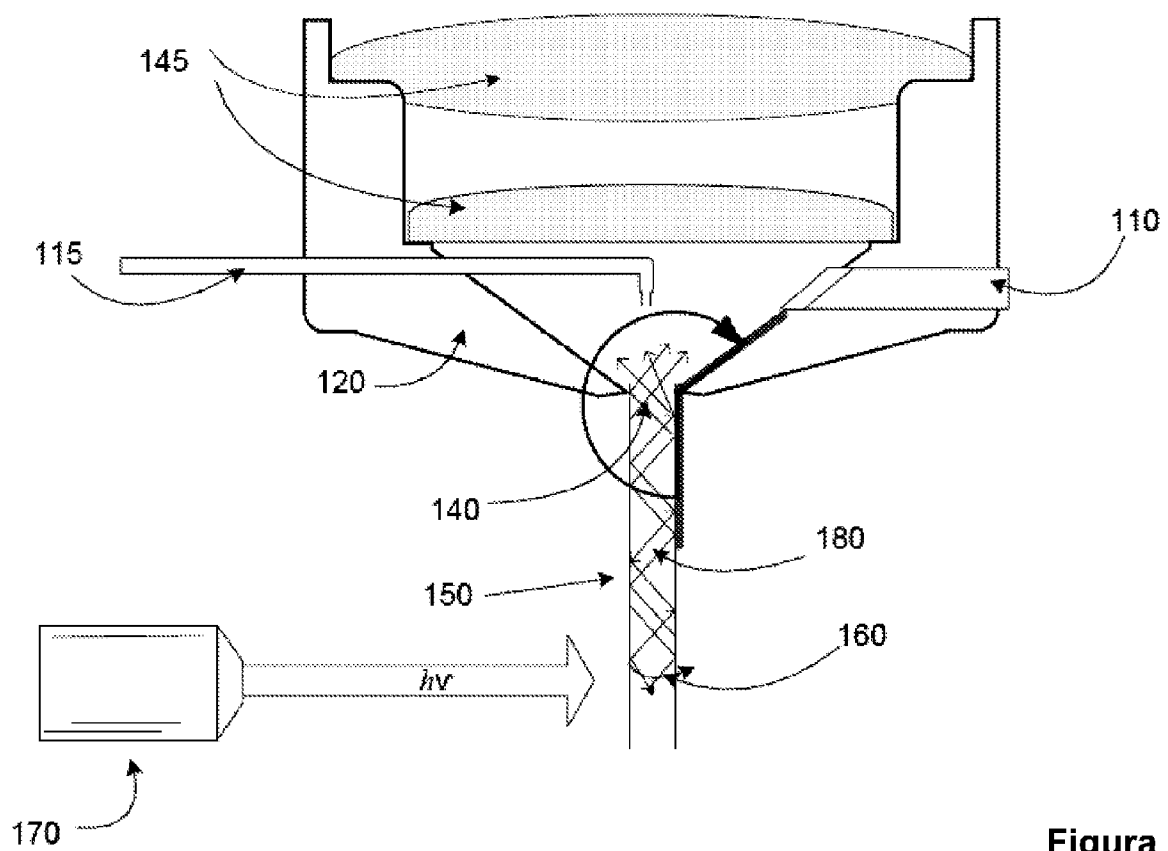


Figura 1B

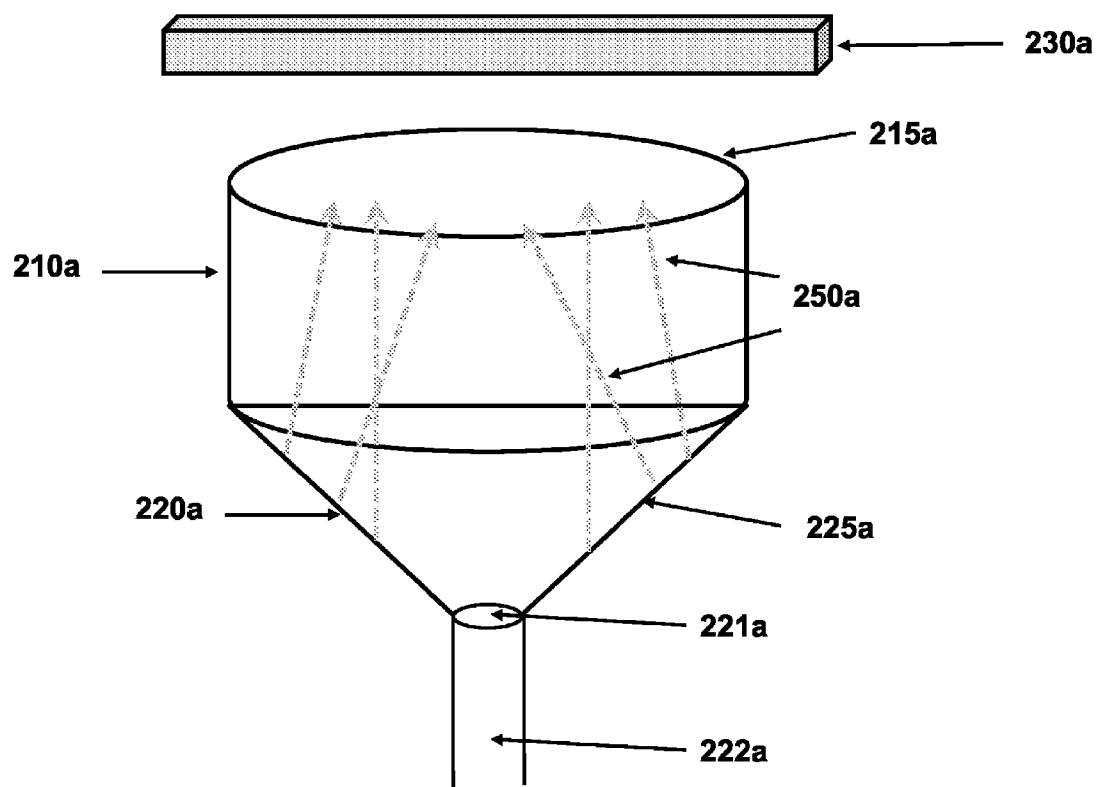


Figura 2A

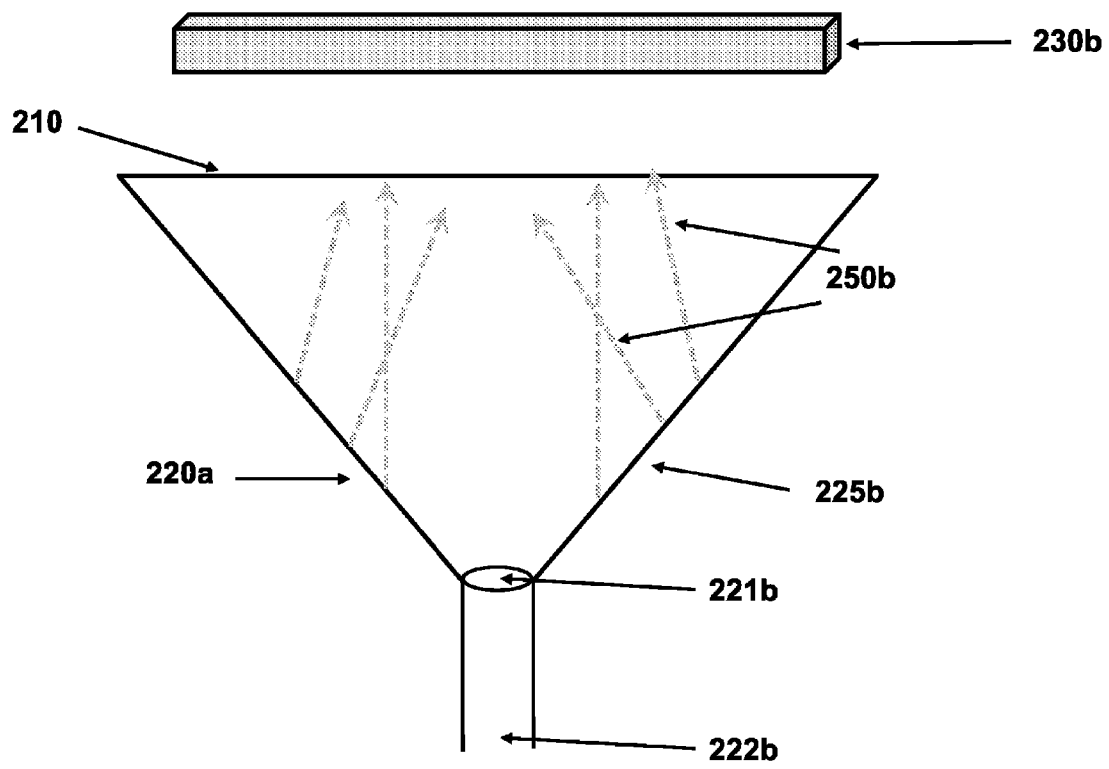


Figura 2B