

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 253**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 1/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2005 E 05775429 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 1771730**

54 Título: **Método y aparato para aplicar fluidos a una muestra biológica**

30 Prioridad:

23.07.2004 US 590843 P

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

09.10.2014

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. INNOVATION PARK DRIVE
TUCSON, ARIZONA 85755, US**

72 Inventor/es:

**LEMME, CHARLES D. y
REINHARDT, KURT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 505 253 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y aparato para aplicar fluidos a una muestra biológica

Fundamento

1. Campo de la invención

5 La invención va dirigida generalmente a la automatización del tratamiento de muestras biológicas, y en particular a un método y aparato para la tinción automatizada de muestras biológicas usando un método a base de un volumen mínimo de fluido tangencial.

10 2. Descripción de métodos relacionados

La tinción de preparados celulares o piezas de biopsia para la visualización morfológica es un método antiguo de hace más de cien años frente a los estándares modernos. Recientemente se han hecho esfuerzos por automatizar el procedimiento de aplicar diferentes tipos de colorantes químicos y moléculas de conjugado biológico a las secciones tisulares. Los instrumentos que se han diseñado para dicho fin incluyen la línea de Ventana Medical Systems de instrumentos a base de un carrusel dual como la 320/ES®, NexES®, BENCHMARK® y la BENCHMARK® ST. Las patentes que describen estos sistemas incluyen la US 5595707, 5654199, 6093574 y 6296809. Otro tipo de pigmento o coloración automatizada es la línea de pigmentos TechMate® descrita en US 5355439 y 5737499.

15 La velocidad de tinción inmunohistoquímica y de hibridación *in situ* del tejido fijado seccionado sobre un portaobjetos de microscopio se encuentra limitada por la velocidad a la cual las biomoléculas conjugadas se pueden difundir por el tejido fijado desde una solución acuosa situada en contacto directo con la sección de tejido. Normalmente, el tejido se "fija" inmediatamente después de su escisión colocándolo en una solución de formaldehído del 10%, que impide que el tejido sea destruido autocatalíticamente por la reticulación de las proteínas a través de los puentes de metileno. Este tejido reticulado presenta muchas barreras adicionales a la difusión que incluyen las membranas bicapa lipídicas que envuelven cada una de las células y orgánulos, y los efectos antes mencionados de la reticulación que genera el proceso de fijación. Las biomoléculas conjugadas (anticuerpos o moléculas de muestra ADN) son relativamente grandes, y su tamaño oscila entre unos kilodaltons y varios cientos de kilodaltons, lo que les obliga a difundirse lentamente en el tejido sólido durante un tiempo determinado, es decir entre varios minutos y unas pocas horas. Las condiciones de incubación típicas son de treinta minutos a 37°C.

20 La velocidad de difusión viene dada por un gradiente de concentración de manera que la velocidad se puede incrementar aumentando la concentración del conjugado en el reactivo. Sin embargo, esto tiene dos efectos perjudiciales. En primer lugar, los conjugados son a menudo muy caros, por lo que aumentar su concentración no vale la pena y tampoco es viable desde el punto de vista económico. En segundo lugar, la cantidad excesiva de conjugado que entra en el tejido queda atrapada en el tejido si se usan grandes concentraciones, y es difícil eliminarla además de provocar unos niveles elevados de color de base no específico. Esta tinción no específica es únicamente ruido. Para reducir el ruido y aumentar la señal de tinción específica, la práctica habitual aconseja utilizar concentraciones bajas de conjugado con largos tiempos de incubación para permitir que el conjugado se encuentre y una solamente a las zonas específicas.

25 La automatización de los procesos previamente manuales de la tinción accionada por difusión únicamente ha incrementado estos problemas debido a las acumulaciones necesariamente grandes de reactivos. Los actuales instrumentos de tinción de histología utilizan volúmenes relativamente grandes de reactivo (100 µl) en unos 300 µl de tampón, tal como revelan las patentes americanas publicadas 6.352.861, 6.296.809 y otras. Esto da lugar a una concentración relativamente baja del reactivo conjugado en el líquido que queda sobre el tejido. Los instrumentos actuales miden el reactivo alternando los chorros de aire tangencial sobre una capa de aceite sobrenadante que gira y contragira cuando entra en contacto debido a los chorros de aire, haciendo que se desplace la capa acuosa que se encuentra debajo. La mezcla es lenta y no especialmente intensa y crea la evaporación de los tejidos que deberá ser contrarrestada. La capa de aceite minimiza la evaporación del lodo acuoso cubriéndolo con una capa de aceite a baja presión de vapor. Finalmente, los instrumentos actuales utilizan grandes volúmenes de líquido para desplazar físicamente los grandes charcos de reactivo de reactivos de baja concentración que están cubiertos con aceite. Este método de lavado produce grandes volúmenes de líquido desechable que se puede clasificar como residuo peligroso, y en cualquier caso puede físicamente romper el tejido por la vigorosa acción del lavado.

30 Sigue existiendo la necesidad de una introducción más rápida de biomoléculas en las secciones de tejido para un procesamiento más rápido y el uso de menor volumen de reactivo.

Resumen de la invención

35 La configuración se dirige a un método de contacto de una muestra biológica con una solución que comprenda la etapa de desplazamiento de una superficie curvada humedecida con una solución cerca de dicha muestra biológica,

de tal manera que la distancia que separe dicha superficie curvada humedecida y dicha muestra biológica sea suficiente para formar una capa de menisco líquida entre las dos.

5 La invención también va dirigida a un aparato para contactar una muestra biológica que se sospecha contiene un biomarcador con una solución que contiene una biomolécula conjugada, que comprende una plataforma para soportar un portaobjetos de microscopio en el que se encuentra una muestra biológica; una tapa deslizante que tiene una superficie inferior curvada situada sobre la plataforma, estando la superficie inferior curvada cerca de una muestra biológica cuando está en funcionamiento; un medio para desplazar la tapa deslizante hacia delante y hacia
10 detrás de la muestra biológica; y un medio para aplicar y retirar la solución líquida que contenga las biomoléculas conjugadas de la tapa.

Breve descripción de las figuras

15 Figura 1 es una vista en alzado del lado derecho
Figura 2 es una vista en alzado alternativa del lado izquierdo, parcialmente seccionada por el centro de la tapa.
Figura 3 es una visión transversal del lado izquierdo, de nuevo parcialmente seccionada por la tapa,
Figura 4 es un detalle de la zona seccionada de la tapa deslizante, el reactivo retenido y su menisco,
Figura 5 es una vista en alzado de una configuración alternativa que muestra una tapa oscilante sobre un
20 portaobjetos,
Figura 6 es una vista en alzado de una configuración alternativa que muestra un mecanismo de contacto a base de una membrana que incluye un tambor de almacenamiento, un tambor rebobinador y una tapa giratoria.

Descripción de las configuraciones preferidas

25 La invención va dirigida a un método para poner en contacto una muestra biológica que se sospecha contiene un biomarcador con una solución, que comprende la etapa de desplazar una superficie curvada humedecida con una solución que contiene la biomolécula conjugada cerca de la muestra biológica de manera que la distancia que separa la superficie curvada humedecida y la muestra biológica sea suficiente para formar una capa de menisco líquido que se desplace entre las dos.
30

El concepto de la invención es relativamente simple, incluso elegante. Con respecto a las figuras en general se coloca sobre el portaobjetos del microscopio 60 una superficie curvada 30 próxima a unas 10-100 micras, de la superficie del portaobjetos. Puesto que la sección más gruesa del tejido o de la muestra biológica 50 es normalmente de 4 a 6 micras, y como máximo de 32 micras, esto permite que quede un espacio significativo para que la superficie curvada 30 se mueva sin tocar el tejido 50. La superficie curvada 30 es parte de una estructura mayor llamada "una tapa deslizante 10", que puede ser de unos 10 mm de largo con un radio de 25 mm en su base. Un volumen pequeño de reactivo líquido 40 forma un menisco a lo largo del portaobjetos en el agujero entre el tejido y la superficie curvada de la tapa. Durante la incubación, la tapa "se desliza" o bien se mueve hacia delante y detrás, a lo largo de la longitud del portaobjetos, tirando del menisco hacia delante y hacia detrás sobre la zona útil del portaobjetos que contiene la muestra biológica. Cuanto más rápida es la velocidad de la tapa, mayor será la mezcla que se lleve a cabo. La tapa se puede calentar de manera que los líquidos que se adhieren a ella también se calienten.
35
40

El lavado se realiza desplazando la tapa fuera del extremo del portaobjetos de manera que el menisco toque una superficie fijada, una almohadilla o bloque 110 que se curve en la dirección opuesta a la tapa y que, por acción capilar, desplace el líquido fuera de la tapa. La solución de lavado se añade a la base de la tapa a través de unos orificios verticales 130, en el bloque de lavado 110. Este flujo de solución de lavado, limpia la tapa y parte de esta solución se adhiere a la tapa por tensión superficial. Luego la tapa retrocede sobre el portaobjetos llevando la solución de lavado con ella, la cual luego se mezcla con el líquido restante en el portaobjetos. El repetir este proceso algunas veces limpia el portaobjetos por dilución en serie.
45
50

La limpieza total de la tapa se puede efectuar una vez se haya retirado el portaobjetos al añadir un agente fuerte, es decir, NaOH pH 14, a la superficie del calentador y deslizando la tapa varias veces sobre el mismo. Luego el calentador/tapa se lava con solución de lavado normal. Esto eliminará restos de tejido del portaobjetos anterior e impedirá la contaminación cruzada entre portaobjetos.
55

Vamos a comentar ciertas definiciones que se utilizarán al interpretar las reivindicaciones y su objetivo último. A los términos no definidos se les debería dar su significado habitual a menos que en el contexto se deduzca algún otro significado distinto.
60

El término "biomolécula conjugada" se utiliza para describir cualquier biomolécula que tenga una capacidad para situarse específicamente y enlazarse a su superficie complementaria. Ejemplos incluyen un anticuerpo que se una específicamente a su epítipo complementario, una muestra de ARN o ADN que se hibridice en su secuencia complementaria en unas condiciones de hibridación, o bien un colorante químico que preferiblemente coloree una proteína en particular como la queratina. Aunque los colorantes químicos en general no se suelen considerar
65

biomoléculas, en el caso de esta aplicación si se consideran como tal. Se conocen en general como “colorantes especiales” en histología.

5 El término “muestra biológica” se puede utilizar en general para hacer referencia a cualquier material biológico que se pueda colocar en un portaobjetos de microscopio o similar básicamente en un formato horizontal. Como muestras biológicas ilustrativas se incluyen las secciones tisulares, los preparados celulares como las citopinas o bien ThinPrep™s (Cytoc, Marlborough, MA) o las micromatrices multigénicas de tejido o de ácido nucleico.

10 El término “biomarcador” pretende significar la plétora de moléculas biológicas marcadas que se pueden detectar y que de algún modo se asocian a un estado patológico. Como ejemplos ilustrativos se incluyen los antígenos, epítomos, las proteínas celulares, las proteínas transmembrana y las secuencias de ADN o ARN. El gen Her-2/neu y la proteína son ambos ejemplos ilustrativos de biomarcadores.

15 Este método es aplicable a otros procesos inmunohistoquímicos comunes como la desparafinización, la recuperación y detección de antígenos (acondicionamiento celular). Para la desparafinización utilizando el proceso acuoso descrito en la patente americana no. 6.544.798B1 (desparafinización acuosa que utiliza calor), el calor se debería suministrar para calentar tanto la solución acuosa que baña la muestra biológica por encima del punto de fusión de la parafina, o bien un calentador situado dentro del soporte del portaobjetos podría calentar directamente el portaobjetos/tejido. El calor debe ser suficiente para calentar la muestra por encima del punto de fusión de la parafina para liberar la parafina a la fase acuosa inmiscible donde luego se retira. Alternativamente, se podría llevar a cabo la desparafinización que requiere el uso de una parafina como el xileno o el limoneno usando este aparato.

20 El tratamiento o acondicionamiento celular que hace que los puntos antigénicos reticulados sean más accesibles para las biomoléculas grandes como los anticuerpos y las muestras de ácido nucleico se puede llevar a cabo usando este método y aparato. Aplicar calor a la muestra es una forma de acondicionar o tratar la célula, por lo que de algún modo sería preciso aplicar calor a la muestra. Además del calentador, descrito con anterioridad, soporte del portaobjetos, el calor se puede aplicar mediante aplicación directa (conducción), conducción indirecta (al portaobjetos del microscopio), convección (aire calentado dirigido a la muestra), o por radiación (infrarrojos o microondas). En la actualidad el preferido es el calor por conducción indirecta. El acondicionamiento de la muestra se efectúa normalmente incubando la muestra de tejido entre 75 y 100°C en una solución acuosa y manteniéndola así durante un tiempo hasta lograr la antigenicidad adecuada, es decir entre 30 y 90 minutos.

25 La invención también va dirigida al aparato para llevar a cabo el método. Generalmente el aparato se puede describir de acuerdo con las figuras siguientes y el texto adjunto, lo que refleja el concepto global de la invención.

30 Las figuras 1-4 muestran la configuración preferida de la invención de la tapa curvada deslizante. Las muestras 1 y 2 son vistas en alzado de los laterales derecho e izquierdo. La figura 3 es una visión transversal del lado izquierdo y la figura 4 es un detalle de la zona seccionada de la tapa deslizante, el reactivo retenido y su menisco. La tapa deslizante 10 se secciona por el centro para mostrar el reactivo líquido 40 que está retenido por la tensión superficial bajo la tapa 10.

35 La tapa puede ser de distintos materiales, pero los preferidos son los plásticos, en particular ULTEM™ (General Electric), y la cerámica que incluye el vidrio. El material que contiene el líquido reactivo se deberá poder mojar y limpiar debido a la gama de biomoléculas que se van a aplicar. Por ejemplo, sustancias químicas, proteínas y ácidos nucleicos. En la configuración preferida la superficie curvada es convexa con respecto al portaobjetos del microscopio. Una forma convexa crea el ángulo correcto con el portaobjetos y la superficie de la muestra de manera que se forma un menisco óptimo. La tapa puede ser tan ancha como el portaobjetos pero en cualquier caso debería cubrir básicamente toda la superficie de la muestra. La superficie curvada 30 se mueve de forma básicamente rectilínea paralelamente a la superficie superior del portaobjetos del microscopio y sobre la superficie de la muestra biológica. Normalmente la distancia que separa la superficie curvada humedecida 30 y la muestra biológica es de unas 15 micras hasta aproximadamente 45 micras.

40 En una configuración alternativa, la tapa puede ser conductora eléctricamente de manera que pueda conducir corriente a través del tejido cuando la tapa esté situada cerca del mismo y en contacto eléctrico a través de una solución electrolítica. La ventaja de la conductividad eléctrica es que se puede impartir un efecto electroforético que permita que las moléculas cargadas sean conducidas dentro del tejido por electroforesis.

45 La tapa 10 tiene dos guías deslizantes 21, 22 en sus extremos laterales, las cuales aparecen juntas únicamente en la figura 1. Estas guías descansan en el borde superior, exterior del portaobjetos del microscopio 60 y tienen una anchura de 0,5 mm, aunque la anchura exacta no es crítica. Colocan la tapa verticalmente y definen el agujero que existe entre la parte superior del portaobjetos y la parte inferior de la parte curvada central de la tapa 30, que se puede ver mejor en las figuras 2 y 4. Solamente una guía deslizante, 21, se puede ver en las figuras 2 y 4 en la sección transversal de la tapa. Es preferible que no quede tejido en este milímetro y medio exterior del portaobjetos 60 donde descansan estas guías. En las figuras 2-4, la tapa se secciona por el centro para mostrar la superficie curvada 30 que abarca la distancia entre las dos guías deslizantes. Esta superficie curvada 30 en esta configuración tiene un radio de 25 mm y está colocada unas 50 micras sobre la base de las guías deslizantes 21, 22. Esto produce

una hendidura de 50 micras entre la base de la superficie curvada 30 y la parte superior del portaobjetos 60. Esta hendidura de 50 micras viene determinada por la extensión vertical de las guías deslizantes 21 y 22 bajo el fondo de la superficie curvada 30 de la tapa 10. La muestra biológica o el tejido 50 se adhiere al portaobjetos 60 y es normalmente inferior a ocho micras de grosor a menos que se trate de un tejido muy blando como el cerebro, en cuyo caso puede ser de hasta 35 micras. La hendidura de 50 micras permite que la tapa 10 se deslice sobre cualquier grosor razonable de tejido 50. Cuando la tapa se retira del portaobjetos 60 y descansa sobre la almohadilla 110, el líquido reactivo 40 se aplica a la parte superior del portaobjetos por medio de una pipeta (no mostrada) en pequeñas cantidades, unos 15 μ l. Por ejemplo, puede tratarse de un pipeteador automatizado como el descrito en la patente americana no. 6.537.818B2. Se pueden utilizar otros diseños de dispensador con efecto similar como el dispensador inline de la patente americana 6.192.945. Cuando la tapa 10 vuelve al portaobjetos 60, el líquido reactivo 40 es atraído hacia la superficie de la base curvada de la tapa donde se adhiere por acción capilar. Forma un menisco en cada extremo que se puede ver bien en la figura 4 (40).

La tapa 10 se "desliza" longitudinalmente a lo largo del portaobjetos 60 mediante una varilla 120 que está acoplada a la sección flexible verticalmente 140, que seguidamente se acopla al centro de la tapa 10. La varilla 120 es activada por un mecanismo como un cilindro de aire accionado por presión o vacío, un tornillo accionado por motor, o bien otro medio convencional de estimulación mecánica de un componente hacia delante y hacia detrás en un único plano que no se muestra en la figura. Ambos bordes deslizantes 21 y 22 están en contacto con el portaobjetos. Se desea que exista algún mecanismo que proporcione un contacto positivo de la tapa con el portaobjetos. El método utilizado en una configuración preferida consiste en acoplar la tapa por medio de una sección verticalmente flexible 140 que está situada entre la varilla 120 y la tapa 10. La sección verticalmente flexible se acopla a la varilla 120 mediante una junta o articulación que puede rotar libremente alrededor del eje de la varilla 120. Estos dos grados de libertad, la rotación vertical y axial, permiten que la tapa esté siempre en contacto con el portaobjetos, independientemente de que aparezcan tolerancias que tiendan a levantar la tapa fuera del portaobjetos. La sección flexible 140, en la configuración preferida, es básicamente una sección delgada de acero inoxidable 302, de aproximadamente 0,15 mm de grosor por 10 mm de ancho y 25 mm de largo. La sección flexible 140 es rígida en todas las direcciones menos verticalmente y permite que la tapa 10 descienda por gravedad hacia abajo sobre el portaobjetos. La sección flexible 140 se acopla a la varilla 120 pasando por un agujero 150 en su extremo más lejano que se dobla hacia arriba 160 y tiene una arandela 170. En las figuras, el orificio 150 está en la sección vertical 160 de la sección flexible verticalmente 140, pero no es visible en estas figuras. Sin embargo, se puede ver que la varilla 120 pasa a través del agujero 150. Otro medio de mantener la tapa en contacto continuado con la superficie del portaobjetos incluye el uso de un equipo con un muelle como un absorbedor de impactos que en funcionamiento normal empuja los bordes deslizantes de la tapa en contacto con la superficie deslizante. Un dispositivo ordinario puede permitir tantos contactos positivos como el método permita.

La tapa oscilará hacia delante y hacia detrás a lo largo del portaobjetos de manera que la superficie de base curvada de la tapa 30 en sus límites extremos se sitúe a unos mm del extremo del portaobjetos en un extremo y a unos pocos mm de la etiqueta del código de barras 100 en su otro extremo. Parte del fluido reactivo queda atrapado bajo la tapa deslizante, pero parte puede quedar sobre la superficie del portaobjetos, sobre el tejido. La tapa deslizante siempre lleva algo de reactivo con ella y lo mezcla con la capa que queda sobre la superficie del tejido. De este modo, el reactivo se mezcla vigorosamente y de forma continuada al tener que pasar a través del conducto estrecho entre el portaobjetos y la base de la parte curvada de la tapa. La química superficial de la superficie del portaobjetos en contacto con la muestra biológica puede verse modificada para volverse más hidrofóbica o hidrofílica, afectando con ello a la cantidad de líquido que queda en la superficie del portaobjetos. Por ejemplo, cuando se utiliza una solución acuosa y se acepta una superficie hidrofílica de la tapa, una superficie más hidrofóbica del portaobjetos hará que la solución permanezca en el espacio estipulado por la tapa y la superficie del portaobjetos, puesto que la tapa será hidrofílica y la solución acuosa será repelida por el portaobjetos hidrofóbico. Al contrario, una superficie hidrofílica del portaobjetos esparcirá la solución por la superficie del portaobjetos, lo que dará lugar a más "charcos" en el portaobjetos. El trabajo ordinario permitirá determinar sin pruebas no necesarias las características de la superficie óptima que se deben utilizar.

En lo que se refiere a la figura 2, para lavar el líquido reactivo fuera del portaobjetos, la tapa es retraída todo el recorrido hasta descansar sobre el bloque 110. La parte superior del bloque se curva en la dirección opuesta desde la base de la tapa con un radio de unos 25 mm. El líquido de lavado es bombeado a través de los orificios de lavado 130 lavando la superficie curvada 30 de la tapa 10 y dejando un volumen de fluido enganchada a ella. La tapa vuelve de nuevo al bloque y se lava con la solución de lavado limpia. Este proceso se repite varias veces lo que da lugar a una dilución en serie del líquido sobre el portaobjetos. Incluso si la dilución es solamente del 50%, se producirá una dilución de un millón de veces en 20 stokes. Todo el fluido en exceso procedente de los lavados fluye por gravedad hacia la base de la cámara o compartimento, no mostrada, de donde sale un tubo de desagüe no mostrado.

La mayoría de reacciones que se utilizan para histología requieren una temperatura elevada entre 40°C y más de 90°C. La capa fina de reactivo acuoso que queda en la superficie del portaobjetos se evaporaría si la humedad fuera inferior al 100%. Al menos hay dos soluciones. Se podría añadir agua pura de vuelta al reactivo de forma mecánica, es decir, dispensar el agua líquida por una boquilla, pipeteador, dispensador. Otro método consiste en mantener la humedad alrededor del portaobjetos en un 100%. Un compartimento o cámara humidificado calentado sería

5 necesario para contrarrestar el secado de la muestra biológica si ésta se expone al calor para que se produzcan reacciones in situ de hibridación, acondicionamiento celular o desparafinización a base de calor. En lo que se refiere a las figuras 1-4, en la configuración preferida, todo el mecanismo se encuentra encerrado en una cámara o compartimento aislado que no se muestra. Este compartimento tiene una puerta en un extremo, a través de la cual se inserta el portaobjetos del microscopio, que tampoco se muestra. El portaobjetos se calienta mediante un resistor de caldeo 70, como el que se menciona en la patente americana no. 6.296,809. En el extremo del código de barras 100 del portaobjetos el resistor 70 tiene una extensión que se encuentra bajo un recipiente o depósito 90. La parte del resistor bajo el depósito se fija para estar siempre a unos cinco grados Celsius por encima de la temperatura del charco acuoso de reactivo del portaobjetos. El depósito calentado contiene unos mililitros de agua 80. Esta agua caliente se va evaporando continuamente llenando la cámara o el compartimento de vapor de agua caliente de manera que el vapor se condensa sobre el portaobjetos húmedo tan rápidamente como se evapora, de manera que no existe pérdida neta de agua del charco de reactivo. Parte del agua se condensará en la superficie interior del compartimento, calentándolo a la temperatura del agua en el recipiente 90. Para minimizar la pérdida de calor del compartimento, éste deberá estar bien aislado.

15 En otra configuración que se muestra en la figura 5, la tapa se puede alargar por todo el eje curvado de manera que no sea preciso que sea desplazada por una varilla hacia delante y hacia detrás sobre la muestra biológica. En lugar de ello, se sacude de tal forma que la capa del menisco se desplaza arriba y abajo bajo la superficie curvada oscilante tal como se muestra en la figura 5, donde 201 es la tapa sacudida y 202 es un borde exterior que se encuentra a unas 50 micras de altura y es equivalente en función a la de las guía deslizantes 21 y 22 de las figuras 1,2, y 4.

25 Otra configuración mostrada en la figura 6 es para oscilar una superficie sobre una membrana que puede cambiar de un portaobjetos a otro, tal como se muestran en la figura 6 donde 101 es una membrana que se puede cambiar de un portaobjetos al siguiente desenrollándose del tambor de almacenamiento 103 y siendo estirada por el tambor de recogida 102. Durante la operación, la tapa 104 se desplaza y arrolla por el portaobjetos, sujeta por los labios del espaciador, 105, que tienen unas 50 micras más que el grosor de la membrana y son equivalentes en su función a las guías deslizantes 21 y 22 de las figuras 1, 2 y 4. Las ventajas de esta configuración incluyen ser capaz de usar una superficie de contacto limpia en recorridos alternativos, minimizando con ello la contaminación cruzada de los reactivos.

30 Todas las acciones aquí descritas pueden ser controladas de un modo automático mediante el diseño apropiado de un interfaz computarizado capaz de controlar dichas operaciones. Ejemplos de instrumentos de tinción automatizados controlados por ordenador incluyen la familia Ventana de instrumentos anteriormente mencionada, en particular, la línea BENCH-MARK®, descrita en la patente americana no. 6.296.809 B1.

35 Aunque aquí se han descrito ciertas configuraciones actualmente preferidas de la invención resulta evidente para los expertos en la materia que se puedan hacer variaciones y modificaciones de las configuraciones descritas. Por ejemplo, aunque se ha mostrado una tapa redondeada para la superficie curvada, se contempla también que se puedan utilizar otras estructuras como esferas, semiesferas o cilindros. De acuerdo con ello, se ha previsto que la invención se limite solamente a la gama requerida por las reivindicaciones adjuntas y las leyes aplicables.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método automatizado que pone en contacto una muestra biológica situada en un portaobjetos para microscopio con una solución que contiene una biomolécula conjugada, que consiste en desplazar una superficie curvada humedecida con la solución cerca de dicha muestra biológica de manera que la distancia que separa dicha superficie curvada humedecida y dicha muestra biológica sea suficiente para formar una capa de menisco líquida que se desplaza entre las dos.
- 10 2. El método de la reivindicación 1 en el que dicha solución contiene una biomolécula conjugada que se elige del grupo formado por un anticuerpo, una muestra de ARN/ADN, o bien un colorante químico o una sustancia química utilizada en la detección.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 en el que dicha muestra biológica es una sección tisular, un preparado celular o una secuencia de ARN/ADN, tejido, proteína o péptido.
- 20 4. El método de la reivindicación 1 en el que dicho tejido contiene un biomarcador elegido del grupo formado por un antígeno, un epítipo, una proteína celular o una secuencia de ADN/ARN.
- 25 5. El método de la reivindicación 1 en el que dicha superficie curvada se ha fabricado a base de metal, plástico o cerámica.
- 30 6. El método de la reivindicación 1 en el que dicha superficie curvada es convexa con respecto a la superficie del portaobjetos del microscopio.
- 35 7. El método de la reivindicación 1 en el que dicha superficie curvada se desplaza de un modo rectilíneo básicamente paralelo a la superficie superior del portaobjetos del microscopio y sobre la superficie de la muestra biológica.
- 40 8. El método de la reivindicación 1 en el que la distancia que separa dicha superficie curvada humedecida y dicha muestra biológica equivale a unas 10 micras hasta 100 micras.
- 45 9. El método de la reivindicación 1 en el que la etapa de desplazamiento de la superficie curvada es controlada por ordenador.
- 50 10. Aparato para poner en contacto una muestra biológica (50) que se sospecha contiene un biomarcador con una solución que contiene una biomolécula conjugada (40), que comprende:
 (a) Una plataforma para soportar un portaobjetos para microscopio (60) en el que se encuentra dicha muestra biológica (50);
 (b) Una tapa deslizante (10) que tiene una superficie inferior curvada (30) que está cerca de dicha muestra biológica (50) cuando está en marcha;
 (c) Un medio para mover dicha tapa deslizante (10) hacia delante y hacia detrás de dicha muestra biológica (50) y
 (d) Un medio para aplicar y retirar el líquido de dicha tapa (10)
- 55 11. El aparato o dispositivo de la reivindicación 10 en el que dicha plataforma es capaz de calentar un portaobjetos (60) situado en la misma.
- 60 12. El aparato de la reivindicación 10 en el que dicha tapa (10) cubre básicamente el ancho de dicho portaobjetos para microscopio (60).
- 65 13. El aparato de la reivindicación 10 en el que dicha tapa (10) es de plástico o de cerámica.
14. El aparato de la reivindicación 10 en el que dicha tapa (10) tiene una superficie inferior curvada (30) capaz de soportar un menisco de líquido (40) formado entre dicha superficie inferior curvada (30) y la superficie superior del portaobjetos.
15. El aparato de la reivindicación 10 en el que dicha superficie inferior curvada (30) tiene un radio de aproximadamente 25 mm.
16. El aparato de la reivindicación 10 en el que la parte inferior de la zona de la tapa (10) que forma el menisco es de 0,01 a aproximadamente 0,10 mm que sobresalen de la superficie del portaobjetos.
17. El aparato de la reivindicación 10 en el que dicho medio para desplazar dicha tapa deslizante (10) hacia delante y hacia detrás consta de una varilla (120) conectada a dicha tapa (10) por un extremo, y de un mecanismo para impartir movimiento a dicha tapa (10) en el otro extremo.

18. El aparato de la reivindicación 17 en el que dicha varilla (120) consta además de un elemento verticalmente flexible (140) conectado a dicha tapa (10) en un primer extremo y a dicha varilla (120) en su segundo extremo.
- 5 19. El aparato de la reivindicación 10 en el que dicho medio para aplicar y retirar el líquido a y de dicha tapa (10) consta de una almohadilla (110) que se adapta para aplicar el líquido a dicha tapa (10) cuando la tapa se acerca a dicha almohadilla (110).
- 10 20. El aparato de la reivindicación 10 en el que dicho medio para aplicar el líquido a dicha tapa (10) consta de un dispositivo pipeteador para aplicar los líquidos a dicha tapa (10).
21. Aparato automático para introducir una biomolécula conjugada en una muestra biológica (50) que se sospecha contiene un biomarcador, que comprende
- 15 (a) Una plataforma para sujetar un portaobjetos de microscopio (60) que tiene una muestra biológica (50);
(b) Una tapa deslizante (10) que tiene una superficie inferior curvada (30) situada sobre dicha plataforma, estando dicha superficie curvada (30) cerca de dicha muestra biológica (50) cuando está en funcionamiento;
(c) Medio para desplazar dicha tapa deslizante (10) hacia delante y hacia detrás sobre la muestra biológica (50);
- 20 (d) Medio para aplicar y retirar el líquido (40) de dicha tapa (10); y
(e) Medio para controlar electrónicamente todas las acciones de dicho aparato

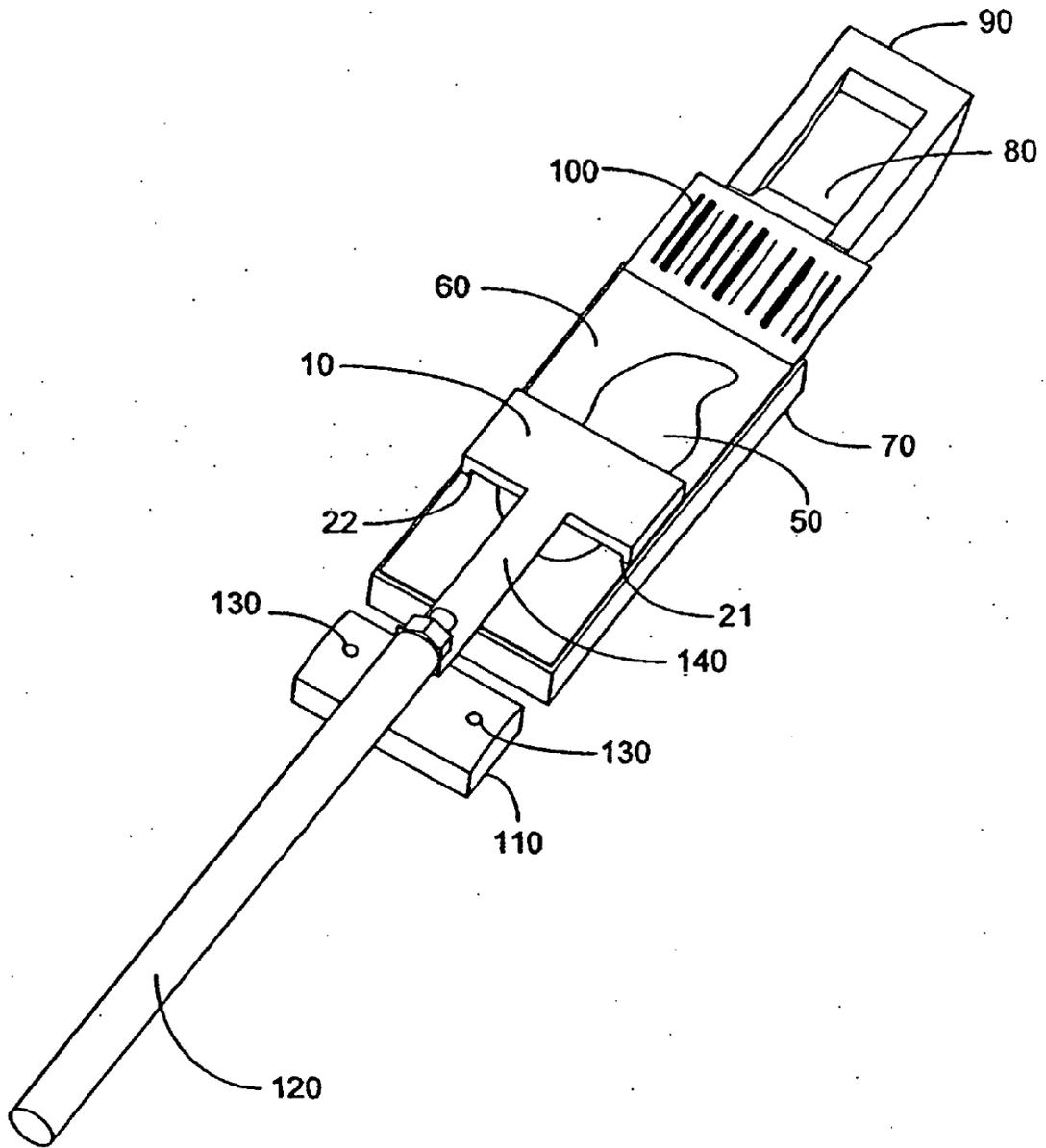


FIG. 1

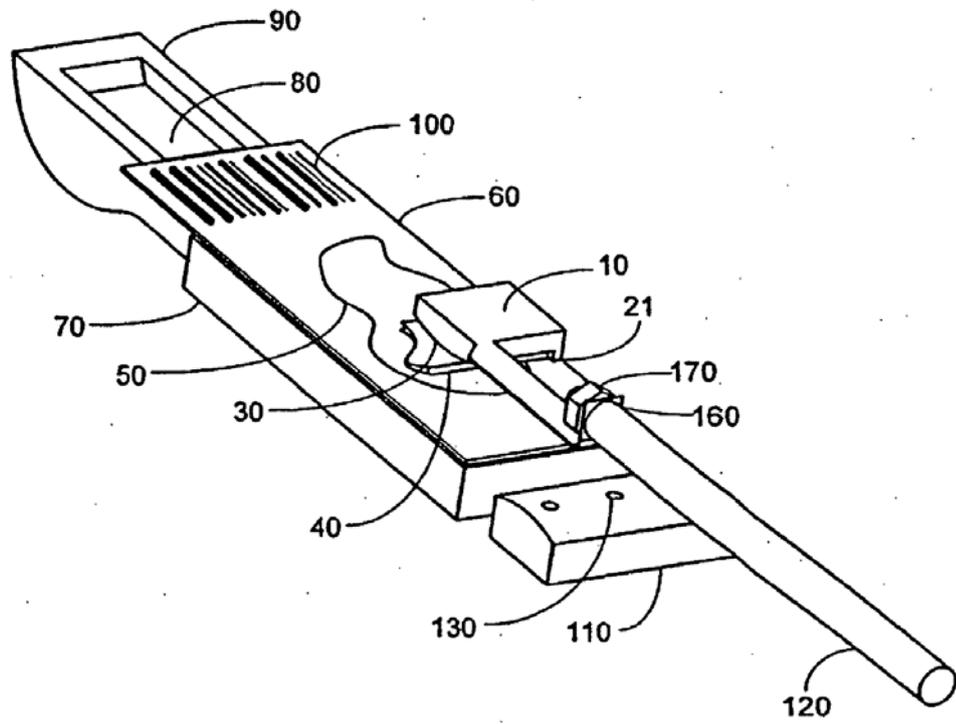


FIG. 2

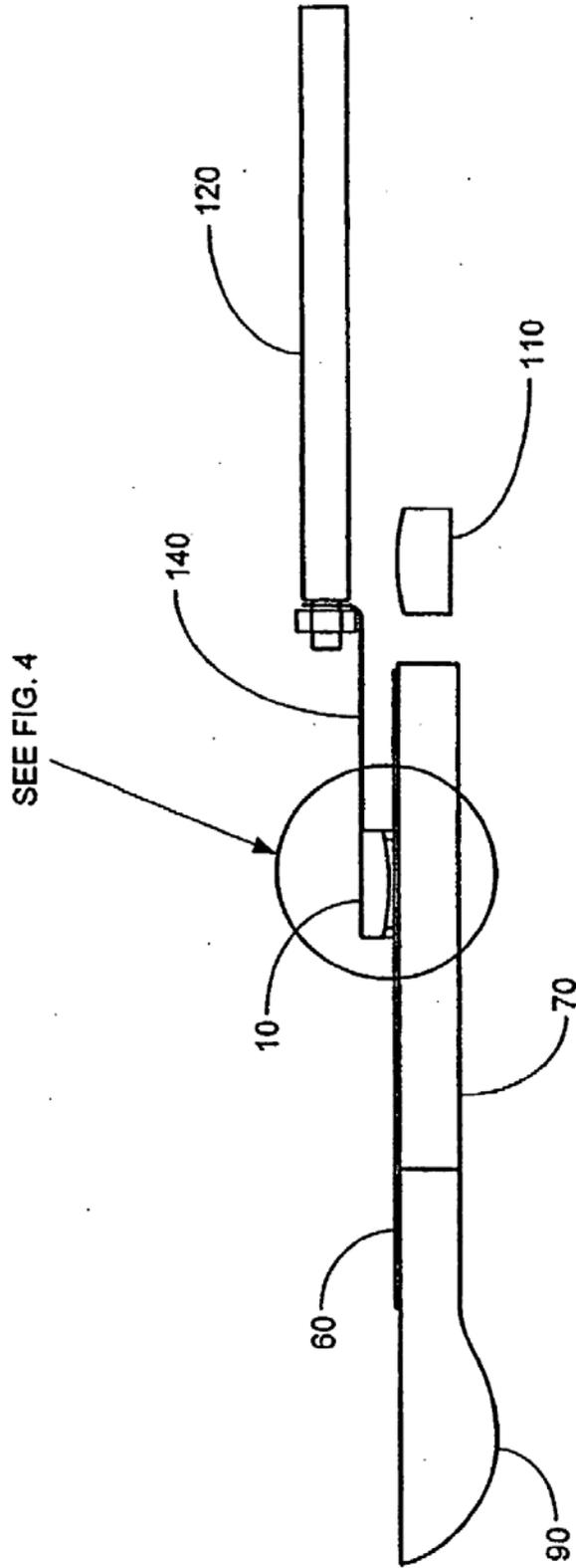


FIG. 3

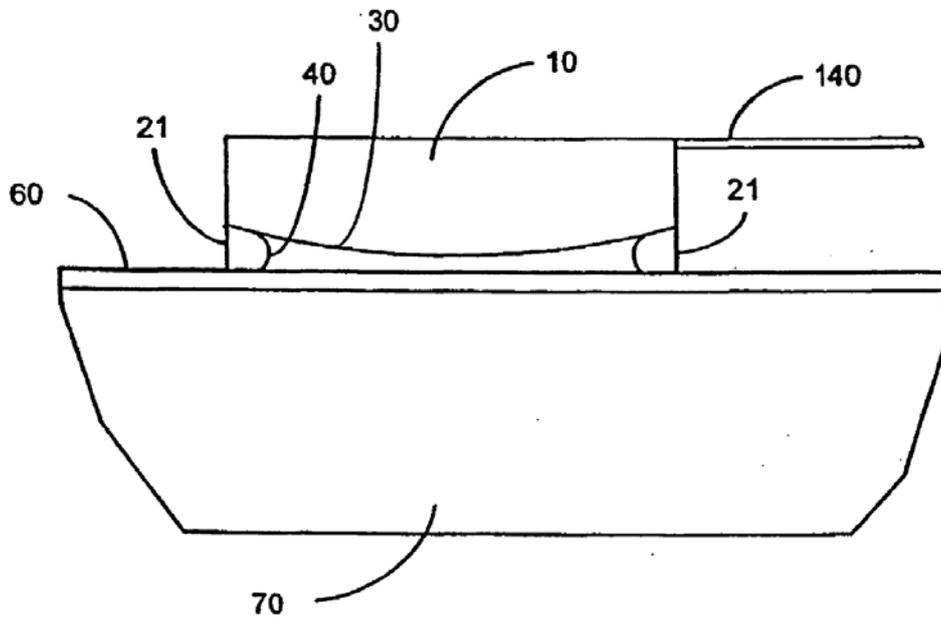


FIG. 4

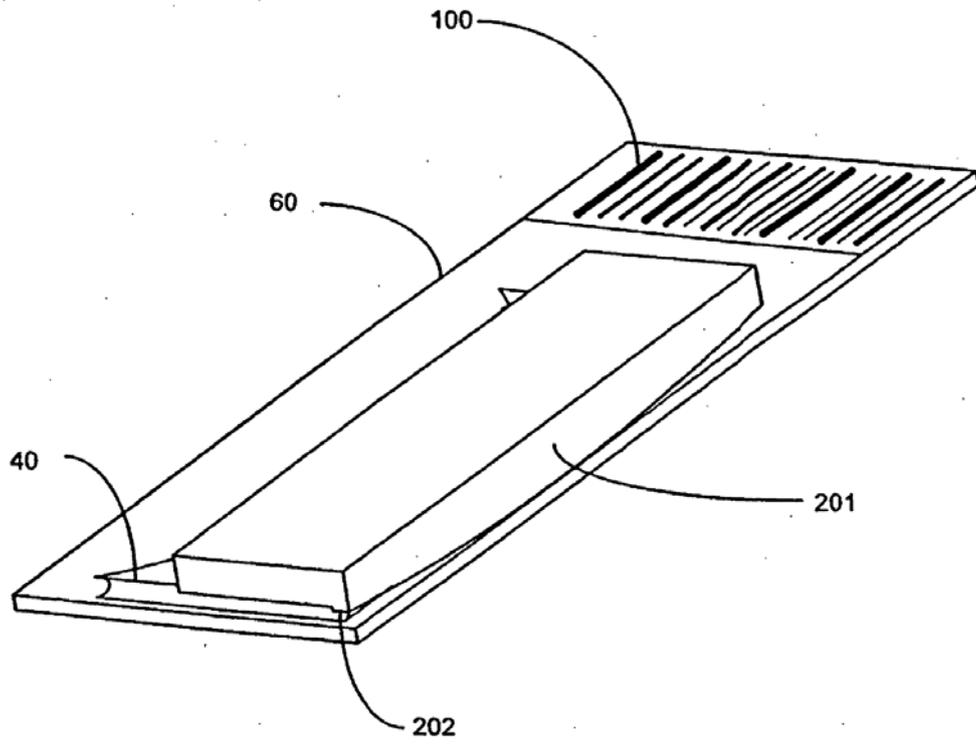


FIG. 5

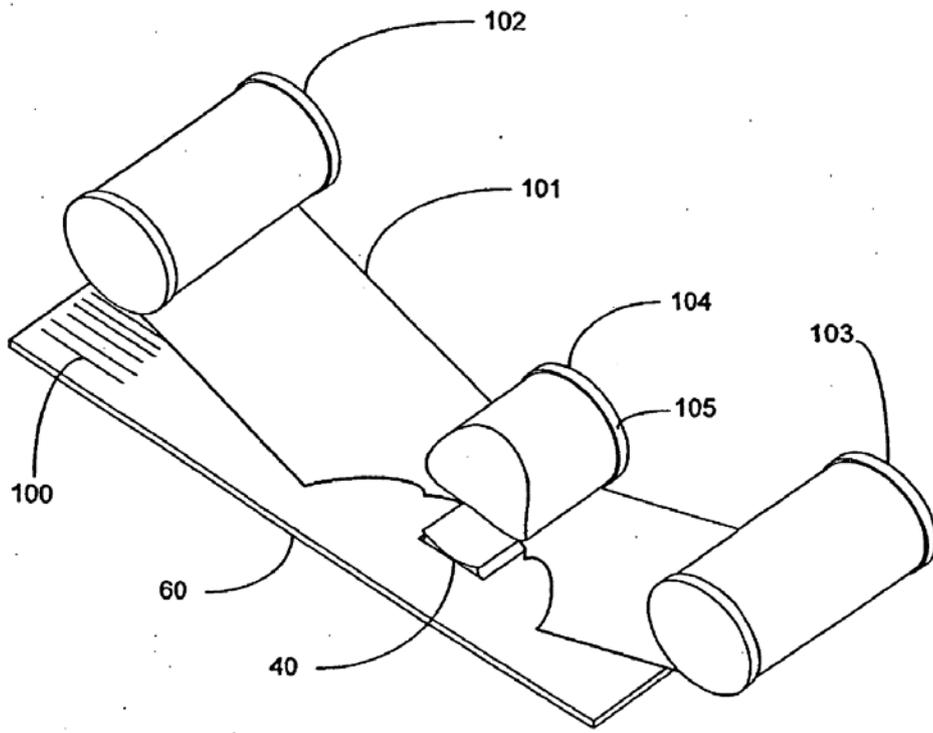


FIG. 6