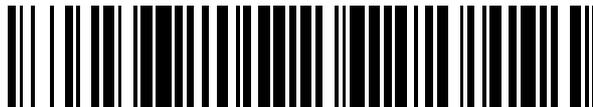


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 585**

51 Int. Cl.:

G01N 1/31 (2006.01)

G01N 35/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2009 E 09732904 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2269028**

54 Título: **Cabezal de dosificación**

30 Prioridad:

14.04.2008 DE 102008018982

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

19.10.2015

73 Titular/es:

**MERZ, HARTMUT (50.0%)
Bachstelzenweg 7
23627 Gross Grönau, DE y
VAN DER WOLK, KAY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MERZ, HARTMUT y
VAN DER WOLK, KAY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 548 585 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

Cabezal de dosificación

5 **Ámbito de la invención**

La presente invención se refiere a un dispositivo automático para la dosificación de reactivos sobre portaobjetos, en donde los portaobjetos comprenden respectivamente una pluralidad de depresiones mutuamente delimitadas, que son apropiadas para recibir muestras celulares y tisulares. El dispositivo contiene un cabezal de dosificación posicionable para la aplicación de reactivos líquidos apropiados en las depresiones de los portaobjetos. La invención se refiere además a un cabezal de dosificación removible, que puede ser montado en el dispositivo, así como un procedimiento para la dosificación automática de los reactivos en las depresiones mutuamente delimitadas de los portaobjetos.

15 **Estado de la técnica**

En el pasado reciente, debido al mejoramiento de los procedimientos de análisis inmunohistoquímicos y de biología molecular, se ha generado una mayor demanda de exámenes tisulares. En particular en el marco de la oncología, en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cancerosas, se apuesta en creciente medida por el análisis de expresión genética.

A este respecto, las muestras de tejido son examinadas directa o indirectamente mediante chips específicos para el tumor en relación a si determinados genes están activados o desactivados o, respectivamente, si existen cambios genéticos (por ejemplo, mutaciones). A este respecto, las muestras tisulares o celulares pueden ser tratadas con anticuerpos o con sondas de ADN o ARN, respectivamente, que luego llevan a una comprobación específica mediante procedimientos de tñido de los genes o productos genéticos (mARN o antígenos). Un método de tñido estándar inmunohistoquímico es, por ejemplo, el así llamado método del complejo de avidina-biotina (ABC), que se describe en Hsu, S.M. et al., J. Histochem. Cytochem, 29, 577 - 580. En la primera etapa de este método, el anticuerpo primario se liga al correspondiente antígeno tisular. Después de una o varias etapas de lavado se efectúa la ligadura de un anticuerpo secundario biotinilado al anticuerpo primario. Después de una o varias etapas de lavado adicionales se aplica un complejo de avidina-biotina-enzima, que se vincula con alta afinidad a la molécula de biotina del anticuerpo secundario. Esto va seguido nuevamente por una o varias etapas de lavado y luego se aplica un cromógeno que en una reacción de coloración reacciona con el complejo de avidina-biotina-enzima con formación de un producto de reacción tñido visible. Los procedimientos biológicos moleculares comprenden la hibridación in situ (ISH) y la hibridación in situ de fluorescencia (FISH), en las que se determina el ácido nucleico, es decir, ARN o ADN, por ejemplo, en tejidos o en células individuales. Para esto se usan sondas producidas artificialmente de ácido nucleico, que mediante pares de bases hibridan el ácido nucleico a ser determinado. En el método de FISH, la sonda es determinada mediante el uso de un colorante fluorescente.

En los análisis de expresión genética se aprovecha el hecho de que de los aproximadamente 25.000 a 30.000 genes de una célula se analizan simultáneamente miles de ellos o incluso todos. Se supone que de los aproximadamente 25.000 genes sólo alrededor de la mitad están activos al mismo tiempo en una célula y que de estos sólo algunos cientos de genes de una célula tienen una relevancia o especificidad tumoral o patológica. De esta manera, con aproximadamente 200 genes se pueden distinguir específicamente los linfomas de células de manto de todos los demás linfomas (se conocen aproximadamente 40 entidades diferentes, que a su vez se pueden clasificar en numerosos subgrupos). Con un número comparable de genes completamente distintos, por ejemplo los linfomas de células de manto se pueden separar de todos los demás tumores. Y también es posible que con un número de algunos cientos de genes se pueda efectuar la distinción entre linfocitos reactivos y linfocitos neoplásicos de un linfoma de células de manto.

Mediante análisis estadísticos de tales análisis de expresión globales muchas veces se logra una significativa reducción de datos y se generan las así llamadas huellas dactilares genéticas, por ejemplo, de tumores o procesos patológicos, que posteriormente se pueden usar como marcadores de diagnóstico. A este respecto, normalmente no se observa ningún menoscabo significativo en la confiabilidad de los análisis. Así, por ejemplo, de aproximadamente 30 genes, que son significativos para los linfomas de células B altamente malignos, se pueden seleccionar respectivamente tres genes que respectivamente se correlacionan más intensamente con un buen pronóstico o que se correlacionan más intensamente con un mal pronóstico. Si estos seis genes se incluyen entonces en una fórmula matemática de pronóstico con un factor positivo o negativo, respectivamente, se puede lograr una afirmación estadística muy buena en cuanto a la supervivencia del paciente. Esta predicción puede ser integrada entonces con una plusvalía significativa para el paciente en los razonamientos clínicos terapéuticos.

Debido a que los tejidos y las células mueren muy rápidamente después de ser extraídos del organismo y se descomponen en el proceso de la necrosis, en el que pueden destruirse los orgánulos, las estructuras celulares y también la arquitectura tisular, los análisis de tejido se efectúan sobre todo en el así llamado tejido FFPE (fijado con formalina y embebido en parafina). Para el diagnóstico en el material FFPE actualmente se dispone de aproximadamente 250 anticuerpos establecidos, en donde para el análisis frecuentemente se usan los así llamados

algoritmos. A este respecto, los tumores en primer lugar son examinados morfológicamente de manera convencional con coloraciones estándar. El patólogo llega entonces a un diagnóstico de sospecha o a diferentes razonamientos de diagnóstico diferencial, en los que se consideran, por ejemplo, 3 o 4 diagnósticos diferentes. Para llegar a un diagnóstico definitivo, se efectúa entonces un número variable de reacciones de coloración inmunohistoquímicas o biológicas moleculares. Para lograr que esto sea lo más económicamente favorable posible, la coloración se hace con los así llamados paneles de anticuerpos algorítmicos, es decir, grupos de anticuerpos específicamente estructurados. Un panel de anticuerpos algorítmico puede comprender, por ejemplo, de cuatro a seis anticuerpos. Diferentes paneles de anticuerpos pueden estar en una relación mutua lógica (por ejemplo, jerárquica), o también se pueden reunir en grupos para determinadas enfermedades. El patólogo procesa los cuestionamientos diagnósticos de manera cada vez más diferenciada de panel a panel, hasta que finalmente se haya establecido el diagnóstico.

De esto resulta que con el material tisular de un paciente es necesario efectuar y evaluar, por ejemplo, entre 10 y 50 exámenes (por ejemplo, en el marco de un así llamado panel de diagnóstico o pronóstico específico para tumores). En vista de la presión de los costes en el ámbito de la sanidad, estos exámenes deben ser realizados de la manera más efectiva en cuanto al tiempo y los costes implicados.

Para la realización de tales análisis tisulares se han propuesto dispositivos de coloración automáticos (también denominados como dispositivos *stainer*).

En tal sentido, en el documento US 6.495.106 se describe un dispositivo de coloración automático que tiene un brazo móvil en tres dimensiones, que a su vez lleva un cabezal provisto de una escotadura. Este cabezal comprende un cabezal de reactivos con una punta que sirve para aplicar los reactivos. El cabezal comprende además una punta de lavado y una punta de soplado, para poder efectuar las diferentes etapas de una reacción de comprobación típica.

Un dispositivo similar se describe también en el documento US 5.948.359, en donde el cabezal de reactivos puede ser provisto de puntas de pipetas de un solo uso para la aplicación de los reactivos, que se mantienen preparadas en un dispositivo de soporte correspondiente.

Estos dispositivos son menos apropiados para efectuar reacciones de comprobación en una pluralidad de portaobjetos, que respectivamente presentan una pluralidad de zonas de reacción apropiadas para muestras celulares o tisulares, debido a que el análisis en total requeriría un período de tiempo muy largo, ya que sólo se dispone de una punta de reactivos. Adicionalmente, por razonamientos diagnósticos existe una gran demanda de poder realizar para un paciente determinado una pluralidad de análisis en muestras tisulares del mismo tejido, a fin de poder establecer y verificar un diagnóstico de acuerdo con el procedimiento algorítmico previamente descrito. Para esto, sin embargo, las muestras de tejido de un mismo material del paciente deben ser mezcladas con diferentes anticuerpos o sondas, a fin de poder delimitar y finalmente diagnosticar el tumor específico o cuadro patológico específico, respectivamente. En los dispositivos descritos en los documentos US 6.495.106 y US 5.948.359, para un cambio del reactivo de comprobación es necesario cambiar la punta de pipeta de la punta de reactivos, lo que resulta en un consumo incrementado de puntas de pipeta desechables y, por otra parte, aumenta adicionalmente el consumo de tiempo del análisis total – y no por último también los costes del análisis total.

El documento US 2008/0.038.836 A desvela un dispositivo de coloración apropiado para un gran número de portaobjetos, que presenta una pluralidad de estaciones de trabajo que se encuentran dispuestas de forma vertical en un cartucho. El dispositivo comprende además una bandeja con una pluralidad de portaobjetos que se encuentran dispuestos horizontalmente en un plano y que se encuentran distanciados entre sí. A este respecto, la bandeja con los portaobjetos puede ser movida por un sistema de transporte entre las diferentes estaciones de trabajo, así como introducida y extraída nuevamente de las estaciones de trabajo. El dispositivo comprende, por ejemplo, una o varias estaciones de trabajo para el desecado o calentamiento, una estación de trabajo para la eliminación de cera y parafina de las muestras de tejido FFPE, así como una o varias estaciones de coloración. La estación de trabajo de coloración presenta una serie de toberas que están conectadas con depósitos que contienen reactivos colorantes o agentes de lavado y que sirven para la aplicación de éstos reactivos o agentes sobre los portaobjetos. El dispositivo descrito en el documento US 2008/0.038.836 A es muy complejo y el transporte de la bandeja con los portaobjetos entre las diferentes estaciones de trabajo consume mucho tiempo. Adicionalmente se dispone de un número limitado de, por ejemplo, dos toberas, las cuales tienen que ser cambiadas para el uso de otros reactivos. Los reactivos se bombean de los depósitos a través de conductos de tubo flexible a las toberas, lo que dificulta el manejo del sistema de posicionamiento X-Y-Z.

El documento US 2006/0.269.447 desvela un robot para la aplicación de líquidos sobre el placas de microtitulación, que se usan, por ejemplo, como placas ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Las placas presentan, por ejemplo, 96 o 384 microdepresiones. El robot comprende un cabezal de pipeta que se encuentra sujeto a un sistema de posicionamiento. El cabezal de pipeta recoge una bandeja con puntas de pipeta en una estación de parqueo y las lleva entonces con ayuda del dispositivo de posicionamiento hasta la placa de microtitulación, en donde los reactivos se dosifican dentro de las microdepresiones de la placa. Las puntas de pipeta, que presentan un volumen de 50 a 250 µl, pueden ser expulsadas después de la dosificación del líquido. El cabezal de pipeta se

desplaza entonces a la estación de parqueo y recoge una nueva bandeja con puntas de pipeta. Dispositivos similares se desvelan en el documento DE 100 40 849 y en el documento US 2004/0.097.010.

5 Adicionalmente, el documento US 5.173.741 A desvela un cabezal de dosificación para el uso en un dispositivo de coloración automático para exámenes en serie en el ámbito de la sanidad, para la dosificación de reactivos sobre una pluralidad de portaobjetos de acuerdo con el concepto general de la reivindicación 1.

10 Tales dispositivos conocidos en el estado de la técnica no son apropiados para una pluralidad de muestras celulares o tisulares dispuestas sobre portaobjetos. La nueva carga de la bandeja con puntas de pipeta después de cada proceso de dosificación individual sobre una placa de microtitulación individual es extremadamente consumidor de tiempo. Durante la nueva carga, las puntas de pipeta son expulsadas y sustituidas por otras nuevas, por lo que los costes del procedimiento se incrementan sustancialmente.

15 En vista del estado de la técnica previamente mencionado, el objetivo de la presente invención consiste en proveer un dispositivo automático para la dosificación de reactivos sobre una pluralidad de portaobjetos, con el que se eliminen completamente, o en la mayor medida posible, las desventajas previamente descritas. Adicionalmente, un objetivo de la presente invención también consiste en proveer un dispositivo para la dosificación de reactivos sobre portaobjetos, con el que se puedan efectuar de manera eficaz y con poco consumo de tiempo reacciones de comprobación en una pluralidad de muestras de tejido, localizadas sobre una pluralidad de portaobjetos, para poder satisfacer la creciente demanda de exámenes inmunohistoquímicos y biológicos moleculares en células y tejidos en el sistema de sanidad, de una forma económica en cuanto al consumo de recursos. Otros objetivos de la presente invención se derivan directamente de la siguiente descripción de la invención, como podrá ser deducido por las personas expertas en la materia.

25 **Breve descripción de la invención**

La presente invención se refiere a un cabezal de dosificación para el uso en un dispositivo de coloración automático para exámenes en serie en el ámbito de la sanidad, destinado a la dosificación de reactivos sobre una pluralidad de portaobjetos, comprendiendo una pluralidad de depósitos de almacenamiento que son apropiados para contener reactivos líquidos y que en un extremo presentan una válvula dosificadora para la dosificación y aplicación de los reactivos sobre los portaobjetos, y que en el extremo opuesto a las válvulas dosificadoras presentan una cubierta hermética al gas, en donde dicha cubierta presenta una conexión provista de válvulas de entrada para la aplicación de una sobrepresión de gas, en donde el volumen medio de los depósitos de almacenamiento es de por lo menos 2,5 ml y el cabezal de dosificación está formado por placas o bloques sustituibles, en donde las cubiertas, los depósitos de almacenamiento y/o las válvulas dosificadoras forman respectivamente un bloque unitario.

40 Adicionalmente, la presente invención se refiere a un dispositivo de coloración automático para exámenes en serie en el ámbito de la sanidad, para la dosificación de reactivos sobre una pluralidad de portaobjetos, comprendiendo dispositivos de sujeción para una pluralidad de portaobjetos, que respectivamente presentan una pluralidad de depresiones mutuamente delimitadas, las cuales son apropiadas para recibir muestras celulares o tisulares, así como un cabezal de dosificación de acuerdo con la presente invención y un dispositivo de posicionamiento para el posicionamiento de los depósitos de almacenamiento del cabezal de dosificación sobre las respectivas zonas de reacción de los portaobjetos.

45 La presente invención se refiere además a un procedimiento para la dosificación de reactivos en una pluralidad de portaobjetos con ayuda de un dispositivo de coloración automático de acuerdo con la presente invención para exámenes en serie en el ámbito de la sanidad, en donde

- los portaobjetos se colocan en el dispositivo,
- 50 - los depósitos de almacenamiento, que están realizados como bloque unitario y que en el extremo opuesto a las válvulas de dosificación presentan la cubierta hermética al gas, en donde dicha cubierta presenta una conexión provista de válvulas de entrada para la aplicación de una sobrepresión de gas, se rellenan con reactivos,
- el cabezal de dosificación es posicionado por medio del dispositivo de posicionamiento en depósitos de almacenamiento mutuamente adyacentes sobre por lo menos tres depresiones adyacentes del portaobjetos, y
- 55 - los reactivos se dosifican dentro de la depresión, en donde el volumen del reactivo es menor que el volumen de la depresión, y en donde por lo menos tres depresiones adyacentes de los portaobjetos son cargadas simultáneamente con reactivos de los depósitos de almacenamiento.

60 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un dispositivo automático para la dosificación de reactivos sobre una pluralidad de portaobjetos, que respectivamente presentan una pluralidad de depresiones mutuamente delimitadas. Las depresiones son apropiadas para recibir muestras tisulares y celulares, en las que mediante los reactivos dosificados a las mismas se efectúan reacciones de comprobación inmunohistoquímicas o biológicas moleculares.

65

Las depresiones, en los que se puede disponer una muestra tisular o celular, se denominan como zonas de reacción. El término "pluralidad", según se usa en el marco de la presente invención, se refiere a un número de por lo menos tres, preferentemente por lo menos seis y en particular por lo menos dieciocho.

5 Los portaobjetos que son apropiados para el uso en la presente invención comprenden, por ejemplo, una placa de base plana, preferentemente transparente, sobre la que se encuentra dispuesta una cuadrícula de nervaduras para proveer depresiones mutuamente delimitadas. El portaobjetos debería estar formado por un material homogéneo, transparente, tal como, por ejemplo, vidrio o polietileno, una capa de teflón, una capa de otro material polimérico preferentemente hidrófobo, que presenta depresiones. A este respecto, las depresiones pueden ser formadas en
10 una capa de espesor originalmente homogéneo, por ejemplo mediante taladrado o fresado, o los portaobjetos también pueden ser fabricados en una sola pieza, por ejemplo, a través del procedimiento de moldeo por inyección. Sin embargo, del portaobjetos también puede presentar una capa de base de espesor preferentemente uniforme, sobre la que se aplican nervaduras en forma de cuadrícula, mediante la aplicación de un precursor de polímero polimerizable hidrófobo apropiado, por ejemplo a través de un procedimiento de serigrafía, y la posterior
15 polimerización del mismo.

Los portaobjetos presentan una pluralidad de, por ejemplo, 6, 18, 24, 72 o más depresiones. Las superficies de sección transversal de las depresiones pueden ser tanto regulares como también irregulares, aunque se prefieren superficies de sección transversal regulares, por ejemplo, cuadrados, rectángulos o círculos. La profundidad de entalladura de las depresiones puede variar, dado el caso, a lo largo de la superficie de sección transversal, aunque de preferencia es constante. Preferentemente, todas las depresiones de un portaobjetos presentan la misma forma. Adicionalmente, en el dispositivo de acuerdo con la presente invención también se pueden usar portaobjetos estándar.

25 El volumen medio de las depresiones se ubica entre 5 y 500 μl . En particular, las dimensiones de la superficie de sección transversal y de la profundidad de entalladura de las depresiones se selecciona de tal manera que las depresiones preferentemente presentan un volumen de entre 5 y 150 μl .

Las dimensiones de una depresión con sección transversal cuadrada o rectangular preferentemente el pueden ser, por ejemplo, de entre 3 a 10 mm x 3 a 10 mm, y la profundidad puede variar entre 0,1 y 2,0 mm. Preferentemente, las depresiones presentan una profundidad media menor de 2 mm y una superficie de sección transversal menor de 100 mm².

Las depresiones en los portaobjetos están delimitadas y separadas entre sí por nervaduras, que pueden ser de forma regular o irregular y presentar un espesor uniforme o no uniforme. Preferentemente, las nervaduras forman una cuadrícula o patrón regular, que en el caso de depresiones con sección transversal rectangular o cuadrada, por ejemplo, de preferencia está formada por nervaduras superpuestas de manera substancialmente perpendicular. En particular, las depresiones pueden estar dispuestas en forma de bandas o en una matriz regular.

40 Las medidas de los portaobjetos preferentemente corresponden a los formatos comercialmente disponibles. Las medidas de los portaobjetos de manera particularmente preferente son de aproximadamente 26 mm x 75 mm. En uno de los extremos del portaobjetos preferentemente se provee un campo de rotulación o identificación, que por ejemplo se puede dotar con etiquetas de código unidimensional o bidimensional, chips de RFID, o algo similar.

45 Por ejemplo, un portaobjetos presenta 18 depresiones. Las depresiones están dispuestas en una matriz regular de 3 columnas y 6 filas. Las depresiones están dispuestas de manera equidistante en las filas. La distancia entre las diferentes filas es respectivamente igual. Un diseño preferente de un portaobjetos con seis depresiones puede derivarse ventajosamente del portaobjetos previamente mencionado con 18 depresiones, si las 3 depresiones dispuestas en una fila se combinan en una sola de presión. De esto resulta un diseño de bandas de 6 depresiones en forma de banda dispuestas paralelamente entre sí. La depresión en el portaobjetos es formada por nervaduras y una placa de base, en donde las nervaduras presentan una altura que corresponde a la profundidad de entalladura de las depresiones. La altura de las nervaduras es mayor que la altura de la hoja de soporte y de la muestra tisular o celular dispuesta encima. La relación de estas dimensiones es preferentemente de por lo menos 1,2, en particular de por lo menos 1,3 y más preferentemente en particular no menor de 1,4. Preferentemente, el volumen de la depresión
50 excede de la suma de los volúmenes formados por la muestra tisular o celular y el segmento de hoja de soporte como mínimo por 1,5 veces, y de manera particularmente preferente por al menos el doble.

Para la elaboración de secciones tisulares planas se usan preferentemente materiales tisulares o celulares FFPE, de los que se obtienen mediante el uso de un micrótopo secciones tisulares o celulares con un espesor de, por ejemplo, 0,5 μm y en particular de aproximadamente 0,5 a 2,5 μm . Las secciones de tejido planas de preferencia se refuerzan mecánicamente, mediante su aplicación sobre una hoja de soporte en particular deformable, tal como, por ejemplo, una hoja de policarbonato. A continuación, los segmentos celulares o tisulares pueden ser recortados de la sección tisular plana con un dispositivo de estampación. A este respecto, la extensión de los segmentos tisulares en el plano perpendicular a su espesor es seleccionada de tal manera que los segmentos de tejido pueden ser recibidos en una etapa subsiguiente por una unidad separadora y depositados en las depresiones. Los segmentos de tejido pueden ser fijados en las depresiones, por ejemplo, mediante el uso de un adhesivo endurecible por UV.

Con el uso de una cuadrícula hidrófoba apropiada, los volúmenes de tejido, hoja y adhesivo también pueden ser aproximadamente iguales (superficie casi plana), porque los líquidos aplicados, debido a las fuerzas hidrófoba hace a causa de la tensión superficial, siempre permanecerían probablemente "abombadas" sobre el tejido en el campo de reacción, de tal manera que no se produciría ninguna contaminación. Una superficie casi plana tiene la ventaja de que en el proceso de recubrimiento final (recubrimiento permanente de los portaobjetos) se tiene que usar relativamente poca cantidad de medio de recubrimiento; este último contiene disolvente que se evapora con el tiempo, por lo que se producen artefactos de contracción; entonces penetra aire en el portaobjetos y éste ya no puede ser examinado bajo el microscopio. El aire presenta otro índice de refracción que el vidrio o el medio de recubrimiento, mientras que el medio de recubrimiento tiene un índice de refracción similar al vidrio.

Debido a que los materiales tisulares o celulares fijados con formalina, embebidos en la matriz de parafina, de los que se han obtenido las secciones de tejido planas, normalmente no son homogéneos, es decir que presentan zonas patológicas y sanas de forma irregular en tres dimensiones, preferentemente se recortan segmentos tisulares o celulares de varias secciones de tejido planas de un mismo material tisular o celular para transferirlo a las depresiones de los portaobjetos. De esta manera se asegura que se va a examinar un cuadro representativo de la muestra tisular. Dado el caso, las secciones tisulares o celulares planas pueden ser inspeccionadas visualmente por el patólogo antes de recortar los segmentos tisulares o celulares, por ejemplo, a fin de filtrar y separar secciones planas que sólo contienen parafina y prácticamente ningún material tisular o celular, o secciones tisulares planas que sustancialmente contienen sólo material tisular o celular sano.

En el documento WO 2007/134.814, por ejemplo, se desvela un dispositivo automático para la producción reproducible de muestras celulares o tisulares dispuesta sobre portaobjetos para ser examinadas. A la citada solicitud, de la que en particular se han tomado las figuras 1 y 2 de la presente solicitud, se hace referencia en toda su extensión en la presente solicitud.

El dispositivo presenta positivos de sostén para recibir una pluralidad, es decir, de uno hasta 200, portaobjetos. Los dispositivos de sostén preferentemente pueden estar sujetos en una o varias bandejas, las cuales entonces, por ejemplo, pueden ser cargadas con portaobjetos en el exterior del dispositivo y luego insertadas en el dispositivo. Obviamente, también es posible que los dispositivos de sostén o las bandejas, respectivamente, estén unidas fijamente con el dispositivo, de tal manera que los portaobjetos se insertan entonces directamente en estos dispositivos de sostén dispuestos en el dispositivo.

El tamaño, forma y configuración de las bandejas es variable. Así, por ejemplo, las bandejas pueden estar realizadas en una sola pieza o en varias piezas. Las bandejas realizadas en una sola pieza, sustancialmente rectangulares, pueden presentar un marco sustancialmente rectangular que presenta varios listones dispuestos de forma paralela y mutuamente adyacente, o una rejilla en forma de cuadrícula, sobre los que se sujetan los portaobjetos. Si el tamaño de una bandeja de este tipo corresponde al tamaño del espacio de reacción del dispositivo, para cada proceso de análisis sólo tiene que insertarse una bandeja en el dispositivo, por lo que se facilita el manejo del dispositivo. En caso de bandejas realizadas en varias piezas, por ejemplo el marco de la bandeja y los distintos listones o cuadrículas en forma de rejilla o piezas de cuadrícula no están unidas fijamente entre sí, sino de manera desprendible. Debido a esto se puede facilitar la carga de las piezas de bandeja, ya que sólo se tiene que insertar una bandeja en el dispositivo. En otra forma de realización se pueden insertar dos o más bandejas en el dispositivo. Esto puede ser ventajoso, por ejemplo, cuando los portaobjetos son cargados en diferentes puestos de trabajo con muestras celulares o tisulares.

Los portaobjetos son unidos de manera desprendible por los dispositivos de sujeción con la o las bandejas, o con el dispositivo, respectivamente, en donde en particular se emplean dispositivos de sujeción mecánicos. Los portaobjetos pueden ser sujetos, por ejemplo, mediante clips no dispositivos de sujeción similares. Adicionalmente, también se pueden usar sistemas de sujeción mecánicos con elementos de sujeción tipo macho y hembra, en donde un tipo de elemento de sujeción se dispone sobre el portaobjetos y el otro sobre la o las bandejas o el dispositivo, respectivamente. De esta manera, por ejemplo, los portaobjetos pueden presentar agujeros de paso circulares que engranan con espigas correspondientes en la o las bandejas o en el dispositivo, respectivamente. Los portaobjetos también pueden presentar, por ejemplo, microganchos en forma de hongo en el lado inferior opuesto a las zonas de reacción, que engranan en un tejido no tejido fibroso, dispuesto en la o las bandejas o en el dispositivo, respectivamente. Mediante elementos de posicionamiento o de guía correspondientes, de esta manera se puede asegurar preferentemente que los portaobjetos sustancialmente siempre se sujetan con la misma orientación en el dispositivo.

La disposición de los portaobjetos condicionada por la disposición de los dispositivos de sujeción en la o las bandejas o en el dispositivo, respectivamente, puede ser regular o irregular, prefiriéndose una disposición regular. En una forma de realización particularmente preferente, la disposición de los dispositivos de sujeción se selecciona de tal manera que los portaobjetos forman una matriz regular, rectangular, con filas y columnas. A este respecto, los portaobjetos preferentemente se insertan de tal manera que los campos de rotulación, que por ejemplo pueden comprender un código o elementos de identificación similares, siempre apuntan en la misma dirección.

El dispositivo preferentemente comprende un dispositivo, con el que diferentes portaobjetos o grupos de portaobjetos pueden ser movidos por vibración, por lo que se pueden mezclar los reactivos dosificados en las zonas de reacción. De esta manera, también se puede favorecer una humectación uniforme de las muestras tisulares y celulares en las zonas de reacción con los reactivos. Adicionalmente, de esta manera también se pueden eliminar mecánicamente, por sacudida, residuos de agente de lavado, dado el caso también después de la rotación de los portaobjetos apoyados de forma giratoria, por ejemplo, por aproximadamente 180°.

El dispositivo preferentemente comprende además un dispositivo para calentar portaobjetos individuales o grupos de portaobjetos. En el caso más simple, el calentamiento puede efectuarse, por ejemplo, por un calentamiento del aire ambiental, o también mediante dispositivos más complejos, tales como, por ejemplo, calefacciones eléctricas dispuestas en la proximidad de los portaobjetos, o mediante la aplicación de radiación IR. Un calentamiento de los portaobjetos, y por ende de las zonas de reacción, es ventajoso, porque de esta manera se puede reducir el tiempo requerido para la incubación es de las muestras tisulares o celulares con anticuerpos, en donde la temperatura está limitada por la desnaturalización de los anticuerpos en aproximadamente 42 °C o, respectivamente, la separación de los híbridos por encima de la temperatura de fusión. Para la inmunohistoquímica, y normalmente para los análisis de FISH, son ventajosas las temperaturas de operación de aproximadamente 37-42 °C. En análisis de ISH, en cambio, se pueden aplicar temperaturas mayores. Una aceleración de las reacciones también se puede lograr mediante un aumento de la concentración de reactivos.

Las incubación es de anticuerpos inmunohistoquímicos normalmente requieren un período de tiempo de 20 a 60 minutos (en promedio 30 minutos), mientras que las hibridaciones biológicas moleculares normalmente requieren numerosas horas o días. Por esta razón, la realización simultánea de análisis inmunohistoquímicos y moleculares normalmente no es ventajosa. Adicionalmente, para los análisis inmunohistoquímicos normalmente debería disponerse de entre 100 y 200 anticuerpos, mientras que para los análisis de FISH e ISH normalmente sólo se requieren de 10 a 30 sondas. Debido a esto, para los análisis inmunohistoquímicos o moleculares preferentemente se usan diferentes cabezales de dosificación. En vista de estas diferencias, eventualmente es ventajoso usar para los análisis inmunohistoquímicos y moleculares diferentes dispositivos de acuerdo con la presente invención, optimizados en cuanto a las respectivas exigencias. También es preferente un dispositivo de acuerdo con la invención con dos submódulos, en donde componentes de hardware y software preferentemente se pueden usar de forma paralela.

Activos de sujeción normalmente están dispuestos de tal manera que los lados superiores de los portaobjetos se encuentran sustancialmente en un mismo plano con las depresiones/zonas de reacción. En otras palabras, los portaobjetos están dispuestos sustancialmente en un plano. Esto tiene la ventaja de que el dispositivo de posicionamiento, que lleva el cabezal de dosificación, sólo tiene que posibilitar movimientos bidimensionales. El dispositivo de posicionamiento preferentemente es un sistema cartesiano X/Y convencional, que comprende, por ejemplo, motores de paso a paso. Normalmente es suficiente una precisión de posicionamiento de $\pm 0,25$ mm. El dispositivo de acuerdo con la invención comprende además un cabezal de dosificación sujetado en el dispositivo de posicionamiento con una pluralidad de depósitos de almacenamiento, que para la realización de reacciones tales como, por ejemplo, reacciones de comprobación por coloración, contienen reactivos líquidos apropiados.

El cabezal de dosificación comprende preferentemente de 1 a 288, preferentemente un múltiplo de 6, depósitos de almacenamiento.

Los depósitos de almacenamiento presentan respectivamente un extremo orientado hacia las depresiones del portaobjetos subyacente, que respectivamente presenta por lo menos una válvula de dosificación con un dispositivo de descarga para la dosificación y aplicación de los reactivos en las depresiones o zonas de reacción, respectivamente. En el extremo opuesto a las válvulas de dosificación, los depósitos de almacenamiento preferentemente presentan cierres o tapas herméticos al gas. Por lo tanto, el extremo opuesto a las válvulas de dosificación de los depósitos de almacenamiento se puede cerrar de forma hermética al gas. A este respecto, los depósitos de almacenamiento pueden estar provistos individualmente de una tapa hermética al gas, o varios uno preferentemente todos los depósitos de almacenamiento pueden presentar una tapa hermética al gas común. La tapa por las tapas preferentemente presentan conexiones provistas de válvulas de entrada, en las que se puede aplicar una sobrepresión de gas a través de uno o eventualmente varios conductos. A este respecto, los reactivos en los depósitos de almacenamiento preferentemente son cargados con una sobrepresión de gas constante, de tal manera que los reactivos líquidos, cuando se abren las válvulas de dosificación, pueden ser descargados en el otro extremo del depósito de almacenamiento a velocidad constante dentro de las depresiones o zonas de reacción. Como se puede usar aire o un gas inerte, por ejemplo N₂. De esta manera, la cantidad deseada a ser dosificada del reactivo puede ser determinada con una calibración correspondiente por el tiempo de apertura de la válvula de dosificación.

De acuerdo con un desarrollo ventajoso de la invención, el cabezal de dosificación presenta un control de dosificación.

A este respecto, se propone comprobar en particular mediante sensores ópticos en o debajo de la salida de las válvulas de dosificación si el reactivo dosificado realmente fue descargado. Para esto, mediante la interrupción de un

rayo de luz, en particular un rayo de luz infrarroja, al iniciarse la dosificación se controla por una parte la dosificación propiamente dicha, es decir, si el proceso de dosificación se ha puesto en marcha y finalizado correctamente. Para obtener una señal de salida segura, por ejemplo independiente del color, se evalúa el incremento (volumen a lo largo del tiempo (dV/dt)), por ejemplo mediante un convertidor A/D (convertidor analógico-digital). Además es posible adicionalmente una evaluación cronológica del proceso de dosificación, en donde se mide el período de tiempo de la interrupción del rayo de luz y así, basándose en la duración medida de la interrupción y la presión del sistema ajustada y vigilada, se calcula el volumen descargado. Esto es ventajoso en el sentido de que de esta manera se incrementa la seguridad de funcionamiento del dispositivo y se posibilita una confirmación del respectivo estado de carga del depósito de almacenamiento en particular.

Alternativamente también es posible que en lugar de un control de flujo óptico se provea un sistema de medición de flujo capacitivo, en el que se reconoce un cambio de capacidad mensurable y se usa para controlar el proceso de dosificación.

Las válvulas de dosificación preferentemente están dispuestas en un bloque de válvulas en el extremo inferior del depósito de almacenamiento. Las válvulas de dosificación preferentemente no están provistas de puntas de dosificación, porque de lo contrario se formaría un volumen de espacio muerto (específicamente el de la punta de dosificación). Es decir que la dosificación se efectúa preferentemente a través de los agujeros de una placa perforada, que se encuentra dispuesta debajo de las válvulas. Dado el caso, la abertura de descarga de la válvula de dosificación puede presentar microagujas o agujas de dosificación, cuyo diámetro sustancialmente menor que la sección transversal de las zonas de reacción o de los depósitos de almacenamiento del cabezal de dosificación, a fin de limitar el volumen muerto.

Adicionalmente, se puede proveer un control de burbujas óptico para detectar burbujas de aire no deseadas en el eluato.

Los depósitos de almacenamiento del cabezal de dosificación presentan una superficie de sección transversal y una altura sustancialmente vertical correspondiente entre ambos extremos, que presentan la válvula de dosificación o la tapa hermética al gas, respectivamente. Los depósitos de almacenamiento presentan preferentemente una superficie de sección transversal media de menos de 1 cm^2 . Los depósitos de almacenamiento preferentemente se cargan con reactivos de un panel algorítmico de coloración. La disposición de los dispositivos de almacenamiento en el cabezal de dosificación preferentemente se debe seleccionar en adaptación al respectivo diseño de los portaobjetos de tal manera que los depósitos de almacenamiento mutuamente adyacentes puedan ser posicionados encima de por lo menos dos depresiones o zonas de reacción preferentemente adyacentes de los portaobjetos, a fin de descargar en las mismas los reactivos. Adicionalmente, la superficie de sección transversal de depósitos de almacenamiento adyacentes se debe seleccionar en adaptación a las dimensiones de las zonas de reacción y de las nervaduras intermedias, de tal manera que dos depresiones o zonas de reacción pueden ser cargadas simultáneamente con reactivos desde los dos depósitos de almacenamiento adyacentes, en donde las los zonas de reacción preferentemente se encuentran adyacentes entre sí. Dado el caso, sin embargo, también entran en consideración una carga simultánea de zonas de reacción mutuamente desplazadas. A este respecto, la disposición de los depósitos de almacenamiento en el cabezal de dosificación de preferencias se selecciona de tal manera que por lo menos tres, preferentemente por lo menos cuatro y más preferentemente por lo menos seis depresiones o zonas de reacción adyacentes puedan ser cargadas simultáneamente con reactivos de comprobación desde los depósitos de almacenamiento.

Se prefiere particularmente los dispositivos de acuerdo con la presente invención que posibiliten tal dosificación multiparalela de reactivos en diferentes depresiones o zonas de reacción en uno o más portaobjetos dispuestos en el espacio de reacción. Debido al modo de funcionamiento multiparalelo se logra una aceleración sustancial el tiempo de análisis y por ende una reducción sustancial de los costes de análisis. Además de esto, los reactivos aplicados de forma paralela múltiple preferentemente pueden ser reunidos en paneles algorítmicos, por lo que se posibilita un diagnóstico patológico particularmente efectivo y específico. El dispositivo de acuerdo con la presente invención de esta manera resulta mucho más apropiado para exámenes en serie en el ámbito de la sanidad que los aparatos automáticos de pipetado conocidos hasta ahora en el estado de la técnica.

El dispositivo de acuerdo con la presente invención, sin embargo, también permite procesar "portaobjetos estándar" con respectivamente sólo una muestra, sin limitación y a costes sustancialmente menores. Para esto, sobre el material de muestra sólo se abre una válvula para la dosificación, de tal manera que a las ventajas previamente mencionadas se suma además una completa flexibilidad. De esta manera, por ejemplo, podría ser necesario un tejido muy heterogéneo no puede ser dividido y que la sección tenga que ser procesada "en su totalidad"; o también podría ser que se tengan que procesar secciones ajenas, que no puedan ser manipuladas adicionalmente.

El volumen de los depósitos de almacenamiento es determinado por su superficie de sección transversal y su altura, es decir, la distancia entre el extremo provisto de una tapa preferentemente hermética al gas y el extremo opuesto, limitado por una válvula de dosificación. El volumen de los depósitos de almacenamiento está dimensionado de tal manera que permite la realización de preferentemente una hasta 200 reacciones individuales, no por ejemplo ciclos de reacción de comprobación de coronación ABC, sin que se requiera una nueva carga del depósito de

almacenamiento. Esto representa una ventaja sustancial adicional frente a los dispositivos conocidos en el estado de la técnica, en los que las puntas de pipeta normalmente tienen que ser desechadas después de efectuarse la dosificación única y para el siguiente proceso de pipetado se tienen que cargar nuevas puntas de pipeta. En los dispositivos de acuerdo con la presente invención, por lo tanto, se omite el procedimiento extremadamente consumidor de tiempo de llevar el cabezal de pipetado a la estación de recarga después de cada proceso de dosificación y desechar las puntas de pipeta de un solo uso, lo cual es indeseable por razones de costes y de protección del medio ambiente. El dispositivo de acuerdo con la presente invención de esta manera puede funcionar de forma sustancialmente más efectiva en cuanto al consumo de tiempo y también en cuanto a los costes, comparado con los dispositivos de pipetado convencionales. El dispositivo de acuerdo con la presente invención, por lo tanto, es mucho más apropiado para exámenes en serie en el ámbito de la sanidad que los aparatos automáticos de pipetado disponibles hasta ahora en el estado de la técnica.

Los depósitos de almacenamiento del cabezal de pipetado preferentemente se dimensionan de tal manera que todos los portaobjetos colocados en el dispositivo con eventualmente por lo menos una bandeja pueden ser cargados con reactivos de comprobación, descargados de los depósitos de almacenamiento, sin que se requiera una recarga intermedia de los depósitos de almacenamiento. Si se supone, por ejemplo, que el dispositivo puede recibir una bandeja con 96 (8 x 12) portaobjetos, que cada portaobjetos tiene 18 (3 x 6) zonas de reacción con un volumen de respectivamente aproximadamente 10 a 20 μ l y que por cada zona de reacción – sin tomar en cuenta los procesos de lavado – se tienen que aplicar reactivos en hasta 6 etapas, se obtiene como resultado para el volumen total de la cabeza de dosificación, es decir, para la suma de los volúmenes de todos los depósitos de almacenamiento, un volumen de aproximadamente 100 a 200 ml. Si se parte de la suposición de que se requieren aproximadamente 120 reactivos en 120 depósitos de almacenamiento, se obtiene como resultado, suponiendo un consumo uniforme de todos los reactivos, un volumen por cada depósito de almacenamiento de aproximadamente 5 ml. También es posible un volumen de 7 ml. En los portaobjetos de 6, se usan aproximadamente 30 a 50 μ l.

Independientemente de estas consideraciones, los depósitos de almacenamiento preferentemente se configuran de tal manera que su volumen medio es de por lo menos 1,5 ml en particular de por lo menos 2,5 ml, más preferentemente de por lo menos 4 ml y todavía más preferentemente de por lo menos 5 ml. A este respecto, todos los recipientes de almacenamiento pueden presentar el mismo volumen.

Para esto, preferentemente el cociente del volumen medio de los depósitos de almacenamiento y del volumen medio de las depresiones debe ser de por lo menos 50.

Debido a que reactivos individuales, como por ejemplo el reactivo de anticuerpo secundario y por ejemplo el líquido de lavado, que sustancialmente son iguales para todas las fracciones de coloración, se requieren con mayor frecuencia y en mayor volumen que otros reactivos (como por ejemplo los reactivos primarios en el método ABC), los reactivos requeridos con mayor frecuencia pueden ser almacenados de forma múltiple en el cabezal de dosificación o en envases mayores en el exterior del cabezal de dosificación. Por ejemplo, es posible disponer depósitos de almacenamiento con capacidad para mayores volúmenes en conjunto a la carcasa del dispositivo propiamente dicho, de tal manera que los mismos y el líquido de anticuerpos secundarios o el líquido de lavado no tengan que moverse conjuntamente con el cabezal de dosificación. Para poder dosificar los mayores volúmenes exigidos de reactivos de comprobación (reactivo secundario y eventualmente terciario), así como de sustrato, reactivo de coloración de contraste o solución de lavado, los mismos pueden ser conducidos a través de varios tubos flexibles, en donde los tubos flexibles son movidos mediante cadenas de arrastre a través del sistema cartesiano hasta una posición cerca del cabezal de dosificación. A este respecto, se propone en particular que en el propio cabezal de dosificación se provean soportes para las salidas de los tubos flexibles, de tal manera que los mismos puedan ser conducidos junto con el cabezal de dosificación encima de los portaobjetos subyacentes. También es posible proveer en la propia salida de tubo flexible a su vez un cabezal de válvula, eventualmente con control de dosificación, por el que se pueda efectuar la dosificación en los volúmenes requeridos de reactivos de comprobación (reactivo secundario y eventualmente terciario), así como de sustrato, reactivo de coloración de contraste como solución de lavado. Alternativamente, también es posible disponer el cabezal de válvula en el propio depósito de almacenamiento, en particular para mantener reducido el peso a ser transportado por el cabezal de dosificación. A este respecto, preferentemente se provee la posibilidad de lavar los sistemas tubos flexibles.

En caso de que los depósitos de almacenamiento no tengan todos el mismo volumen, el depósito de almacenamiento más pequeño preferentemente presenta un volumen de aproximadamente 5 ml o más.

En una forma de realización particularmente ventajosa, el cabezal de dosificación puede estar construido en forma de "sandwich" con placas o bloques sustituibles y presentar, por ejemplo, una tapa hermética, un bloque de depósitos de almacenamiento reunidos en forma de unidad, un bloque de válvulas de dosificación y/o un bloque de sensores de flujo. Las diferentes placas o bloques se pueden sustituir conforme a lo necesario, por ejemplo en el caso de válvulas desgastadas o en el caso de depósitos de almacenamiento permanentemente contaminados por sedimentos, cambiándolos por otras placas o bloques. Esto aumenta sustancialmente la facilidad de mantenimiento y provee una modularidad para eventuales ampliaciones. Asimismo, esta posibilidad de sustitución modular de los diferentes placas o bloques del cabezal de dosificación permiten un funcionamiento económico del dispositivo de acuerdo con la presente invención, ya que en particular en caso de una contaminación de los depósitos de

almacenamiento del cabezal de dosificación solamente se tienen que cambiar los mismos, pero no las costosas válvulas de dosificación.

5 Uno o varios cabezales de dosificación preferentemente pueden ser usados de forma removible en un soporte de cabezal de dosificación. De esta manera se facilita la sustitución, por ejemplo, de cabezales de dosificación vacíos o la fijación de un cabezal de dosificación con otros reactivos. También el propio cabezal de dosificación puede ser marcado mediante códigos preferentemente elegibles a máquina, para poder ser identificado de esta manera.

10 Los recipientes de almacenamiento conforme a lo necesario pueden estar equipados con un sensor de llenado. Alternativamente, el sistema en su totalidad puede estar equipado con un dispositivo de detección del estado de carga, por ejemplo en forma de un sensor de triangulación. Después de retirar la obturación superior de los depósitos de almacenamiento del cabezal de dosificación (tapa), los depósitos de almacenamiento individuales del cabezal de dosificación pueden hacerse pasar por debajo del dispositivo detector del estado de carga y el estado de carga de los distintos depósitos de almacenamiento de esta manera puede ser determinado de forma simple y efectiva.

15 En una forma de realización preferente, los cabezales de dosificación sujetos en el soporte del cabezal de dosificación y parcialmente vacíos o completamente vacíos, o los depósitos de almacenamiento sujetos en el cabezal de dosificación, respectivamente, pueden ser movidos por el sistema de posicionamiento hasta una estación de recarga o estación de carga, respectivamente. Para prevenir una recarga manual de los volúmenes relativamente pequeños en el cabezal de dosificación y por ende una fuente de errores (confusión de los reactivos en caso de una recarga manual), la estación de recarga o estación de carga preferentemente puede funcionar de forma automatizada y es apoyada por un software correspondiente. El cabezal de dosificación montado en el sistema cartesiano es movido debajo de una estación de recarga fija, es decir estacionaria, que está provista de depósitos de almacenamiento de mayor tamaño con los reactivos empleados. Los diferentes depósitos de almacenamiento en el cabezal de dosificación se vuelven a recargar entonces de forma automatizada e individual. Este respecto, los volúmenes previamente dosificados de los respectivos depósitos de almacenamiento son conocidos por el mando del dispositivo (almacenamiento remanente), en particular mediante la detección del flujo de descarga por el control de dosificación y/o los sensores del estado de carga en los distintos depósitos de almacenamiento. Antes de este proceso de llenado solamente sería necesario remover la obturación superior (tapa) de los depósitos de almacenamiento, lo que en principio también se puede hacer de forma automática.

20 Los depósitos de almacenamiento del cabezal de dosificación preferentemente están numerados. En una forma de realización preferente, los distintos depósitos de almacenamiento presentan respectivamente elementos de identificación y pueden ser controlados individualmente o en grupos.

25 Las reacciones de comprobación inmunohistoquímicas o biológicas moleculares normalmente son reacciones de varias etapas, en donde después de cada etapa de reacción normalmente se efectúa una etapa de lavado. Así, por ejemplo, la reacción de coloración estándar inmunohistoquímica, el así llamado método ABC (método de avidina-biotina-complejo), presenta por lo menos 3 etapas de reacción (dosificación con anticuerpo primario, anticuerpo secundario y reactivo terciario), en donde después de las diferentes etapas de reacción se efectúan respectivamente 3 etapas de lavado y después de cada etapa de lavado se efectúa respectivamente de preferencia una etapa de ligero secado (no un de secado completo). También los procedimientos estandarizados biológicos moleculares ISH (hibridación in situ) o FISH (hibridación de fluorescencia in situ) son procedimientos de varias etapas.

30 En una forma de realización ventajosa del dispositivo de acuerdo con la presente invención, para efectuar las etapas de lavado se provee una cubeta rellena con líquido de lavado debajo del plano de los portaobjetos. En esta forma de realización, los portaobjetos eventualmente dispuestos en bandejas pueden ser transferidos individualmente y/o conjuntamente con otros portaobjetos desde una primera posición, apropiada para efectuar las reacciones de comprobación, a una segunda posición ubicada dentro del recipiente.

35 Ventajosamente, los portaobjetos están dispuestos en una disposición en forma de matriz con filas y columnas, en donde los listones con portaobjetos, que forman las columnas, pueden ser rebajados individualmente y puestos en contacto así con el líquido de lavado. Obviamente, también otras partes parciales de la matriz de portaobjetos, tales como filas, partes de columnas, etc., pueden disponerse de forma rebajable. Los listones de portaobjetos, que forman las columnas o las filas, respectivamente, de manera alternativa o adicional también pueden disponerse de forma giratoria, de tal manera que los portaobjetos pueden ser transferidos mediante un giro al líquido de lavado. Por motivos de economía de tiempo es ventajoso si los portaobjetos individuales o grupos de portaobjetos de la totalidad de portaobjetos pueden ser rebajados, ya que los portaobjetos no rebajados pueden continuar siendo controlados por el cabezal de dosificación y cargados con reactivo. Además, para una determinada etapa de reacción el tiempo de acción de los reactivos sobre las muestras tisulares o celulares preferentemente debería ser sustancialmente igual en las distintas zonas de reacción.

40 La cubeta de lavado dispuesta debajo del plano de portaobjetos puede estar hecha, por ejemplo, de acero inoxidable (acero VA). La misma preferentemente presenta una entrada y una salida para el líquido de lavado, a fin de prevenir la contaminación de las zonas de reacción por el líquido de lavado contaminado. La solución de lavado, por ejemplo,

puede estar formada sustancialmente por agua, a la que para prevenir la formación de gérmenes se pueden añadir detergentes y, por ejemplo, Na ácido. También el cambio constante de la solución de lavado sirve para prevenir la formación de gérmenes.

5 Por medio de un sensor de nivel se ajusta un nivel de líquido preferentemente constante del líquido de lavado en la cubeta de lavado. La altura de nivel es ajustable y, por ejemplo, puede ser adaptada a la posición de los portaobjetos girados en 180° con las zonas de reacción dirigidas entonces en dirección hacia la cubeta de lavado.

10 El mecanismo de lavado propuesto de acuerdo con la presente invención mediante la transferencia de uno o varios portaobjetos a la cubeta de lavado con un gran exceso de líquido de lavado representa una aceleración y simplificación sustancial del proceso de lavado. No se ha observado ninguna contaminación por propagación de los distintos reactivos de un portaobjetos a otro en este tipo de proceso de lavado, cuando el volumen de la cubeta de lavado se dimensiona con un tamaño suficientemente grande. El volumen de la cubeta de lavado preferentemente equivale a por lo menos 100 veces el volumen de las zonas de reacción lavadas. Si se supone que 10 portaobjetos con respectivamente 18 zonas de reacción, que respectivamente presentan un volumen de 50 µl, se lavan al mismo tiempo, el volumen de la cubeta de lavado debería ser de por lo menos aproximadamente 1000 ml. Independientemente de esta estimación, la cubeta de lavado preferentemente puede presentar un volumen de por lo menos 500 ml, en particular de por lo menos 1 l y más particularmente de por lo menos 1,5 l.

20 Después de cada proceso de lavado, las zonas de reacción normalmente presentan restos de líquido de lavado, que preferentemente se eliminan para prevenir una dilución indeseable del reactivo en la siguiente etapa de reacción, o incluso la inundación de la zona de reacción; esto último podría resultar en una contaminación de otras zonas de reacción del portaobjetos. Para la eliminación del líquido de lavado preferentemente se puede usar una corriente de aire o de otro gas de lavado en particular inerte, tal como N₂, dirigida sobre los portaobjetos. La carga con aire o con un gas de lavado preferentemente se efectúa de tal manera que se forma una corriente laminar de aire o gas. A este respecto, sin embargo, es importante que las zonas de reacción nunca se sequen completamente, lo que podría resultar en una desnaturalización de las muestras celulares o tisulares.

30 Para prevenir el de secado de las muestras celulares o tisulares, el espacio de reacción preferentemente presenta una cubierta, de preferencia en forma de una tapa de cubierta, para cerrar el espacio de reacción total del dispositivo. La cubierta se usa de manera particularmente ventajosa en combinación con la cubeta de lavado dispuesta debajo del plano de los portaobjetos. Mediante un ligero calentamiento del líquido de lavado en la cubeta de lavado, se evapora algo de líquido de lavado y entra en el espacio de aire o gas encima del plano de los portaobjetos, por lo que se obtiene una cámara de reacción templada y húmeda.

35 El dispositivo preferentemente presenta un panel de manejo central, tal como por ejemplo un panel táctil VGA de ¼ o de 1/1. Un interface de software al software de patología de orden superior no se requiere necesariamente, debido a que el dispositivo realiza los análisis de forma autónoma, sin que para ello se requiera una transferencia de datos desde sistemas existentes.

40 Sin embargo, aun así preferentemente se proveen los siguientes interfaces:

- Un interface de USB/Ethernet para una eventual protocolización e interacción con el software de orden superior (software de patología o, por ejemplo, también Patho-Link y/o algo similar), por lo que por ejemplo las solicitudes/encargos de un evaluador se pueden introducir en el sistema directamente en el microscopio, para luego ser procesadas en el laboratorio y por la máquina sin confusiones después de una codificación correspondiente. De esta manera se pueden obtener ventajas logísticas. A este respecto, el interface de Ethernet puede estar configurado como interface de TCP/IP para la conexión del dispositivo de acuerdo con la presente invención con aparatos periféricos, tales como, por ejemplo, una impresora u otros aparatos de datos técnicos.
- Un interface de ISDN/analógico/Ethernet para el mantenimiento remoto.

55 En particular, además de las conexiones bidireccionales convencionales conocidas, basadas en cable, también se proponen conexiones de datos bidireccionales modernas inalámbricas, en particular conexiones de datos establecidas mediante radiocomunicación.

60 Las secciones de FFPE-micrótopo deben ser pretratados antes del análisis inmunohistoquímico o biológico molecular. Para esto, las secciones primeros son desparafinadas mediante un agente disolvente (por ejemplo, 3 x 10 minutos en un baño de xylol), luego son transferidas a través de una serie alcohólica decreciente (por ejemplo, 100 %-96 %-70 %-70 % de etanol durante respectivamente 1 minuto) a una solución acuosa, para finalmente ser tratadas con un procedimiento térmico en una solución tampón (para esto se puede usar un tratamiento en horno de microondas, olla de presión u olla de cocción a vapor).

65 Este pretratamiento de las secciones o de las muestras tisulares o celulares depositadas en las depresiones, respectivamente, se puede hacer en el dispositivo de acuerdo con la presente invención. Para esto, los reactivos requeridos deben ser cargados en los depósitos de almacenamiento el cabezal de dosificación y se debe proveer

dispositivo correspondiente para el tratamiento térmico de las secciones. Se ha determinado que tal ampliación del dispositivo de acuerdo con la presente invención presenta la tendencia de aumentar la complejidad y, por lo tanto, los costes del dispositivo y menoscaba la robustez del dispositivo. A esto se suma que en la práctica las secciones, con miras al anticuerpo primario a ser empleado, preferentemente se someten en parte a un tratamiento térmico diferente (por ejemplo, en el horno de microondas, en la olla de vapor o la olla de presión) y preferentemente se usan diferentes soluciones tampón. Como ejemplos para un tratamiento distinto preferente de las secciones para el uso de diferentes anticuerpos primarios cabe mencionar lo siguiente:

HSP 90: 10 min. Proteinasa K: 1 Trpf. PK (DAKO Cytomation, código No. S 2019) en 2 ml de medio de dilución (DAKO Cytomation, código No. S 2032) en RT.

CyclinA: 45 min cocción en la valla de vapor (MultiGourmet, marca Braun) con ácido cítrico (2g de ácido cítrico mono hidrato / 1,0 l A.d., pH6).

Jaw 1/Ki-67: 20/15 min. olla de vapor con ácido cítrico (2g de ácido cítrico mono hidrato / 1,0 l Ad., pH6).

Preferentemente, por lo tanto, se usan dispositivos de acuerdo con la presente invención que no están configurados para el tratamiento previo de secciones tisulares o celulares.

Los reactivos para las reacciones de comprobación inmunohistoquímicas y biológicas moleculares están disponibles comercialmente y se seleccionan en función del método de examen deseado. Para exámenes inmunohistoquímicos, actualmente se dispone de aproximadamente 250 anticuerpos establecidos, que en particular se pueden usar para realizar el método de coloración estándar inmunohistoquímico, el así llamado método del complejo de avidina-biotina (método ABC).

El cabezal de dosificación o, respectivamente, el soporte del cabezal de dosificación del dispositivo preferentemente está provisto de un dispositivo de refrigeración formado por elementos de Peltier. De esta manera se asegura que los reactivos que se encuentran en los depósitos de almacenamiento del cabezal de dosificación sean estables a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Alternativamente, también se propone, de manera similar a la estación de recarga, proveer una estación de refrigeración, en la que el cabezal de dosificación puede ser movido mediante el dispositivo de posicionamiento. Esto es ventajoso, debido a que la masa del cabezal de dosificación a ser movido se reduce sustancialmente comparado con la variante del cabezal de dosificación que presenta un dispositivo de refrigeración, y por lo tanto es posible dimensionar de manera mucho más ventajosa el dispositivo de posicionamiento. A este respecto, el cabezal de dosificación después de finalizar el proceso de coloración es desplazado automáticamente a la estación de refrigeración y los reactivos que todavía se encuentran dentro de los depósitos de almacenamiento del cabezal de dosificación se refrigeran para prolongar así su periodo de aptitud para el uso. En general, por ejemplo, los reactivos primarios y secundarios y el reactivo terciario requeridos para el método ABC son relativamente estables en una solución de tampón y bajo refrigeración pueden almacenarse durante un periodo de tiempo que puede variar de 1 a 4 semanas y hasta de 6 o 12 meses.

En un desarrollo adicional del dispositivo de acuerdo con la presente invención, que no presenta ningún dispositivo de refrigeración en el cabezal de dosificación ni tampoco una estación de refrigeración en la que pueda ser introducido el cabezal de dosificación, se puede proveer una función de descarga o de almacenamiento, respectivamente. En la estación de vaciado preferentemente automática, el cabezal de dosificación puede ser introducido por medio del dispositivo de posicionamiento para el vaciado completo del cabezal de dosificación y para el almacenamiento de los reactivos residuales descargados del cabezal de dosificación. A este respecto, después de finalizar una etapa de coloración y después de retirar los portaobjetos del dispositivo, preferentemente se introducen depósitos de almacenamiento en los alojamientos de portaobjetos o en otros alojamientos apropiados (bandejas), en los que se efectúa el vaciado completo de los reactivos que todavía se encuentren en los depósitos de almacenamiento del cabezal de dosificación con ayuda de las válvulas de dosificación. Preferentemente, estos recipientes están dotados con elementos de identificación, por ejemplo códigos 1D o 2D, que pueden ser leídos por un aparato de lectura provisto en el cabezal de dosificación. En otras palabras, el cabezal de dosificación y/o el soporte del cabezal de dosificación pueden presentar un dispositivo de lectura para los medios de identificación fijados en los portaobjetos. De esta manera se asegura que el cabezal de dosificación descargue los reactivos residuales en los depósitos de almacenamiento previstos para esto. A continuación, los depósitos de almacenamiento pueden ser removidos y almacenados en un dispositivo de refrigeración separado.

En el método ABC, en la primera etapa el anticuerpo primario se liga al correspondiente antígeno tisular. Anticuerpos primarios apropiados son, por ejemplo:

CyclinA (Novocastra Laboratories Ltd., Klon 6E6):	1:50
Hsp90 α/β (N-17, sc-1055, Santa Cruz Biotechnology, Inc.):	1:150
Jaw1 (E-19, sc-11688, Santa Cruz Biotechnology, Inc):	1:150
Ki-67(Clon Mib-1, DAKO Cytomation, M7240, Denmark):	1:100

en donde la dilución del anticuerpo primario a la concentración indicada se efectúa, por ejemplo, con "ChemMate" Antibody Diluent (por ejemplo, DAKO Cytomation S 2022). El anticuerpo primario correspondientemente diluido puede ser dosificado entonces en las respectivas zonas de reacción de los portaobjetos. El tiempo de reacción del anticuerpo primario es de, por ejemplo, 20-30 minutos.

5 Después se efectúan una o varias etapas de lavado, a la que respectivamente sigue una etapa de ligero secado, que sin embargo no debe producir un desecamiento completo de la muestra celular o tisular en las zonas de reacción.

10 En la siguiente etapa se efectúa la ligadura de un anticuerpo secundario biotinilado al anticuerpo primario. Como reactivos de anticuerpo secundario cabe mencionar, a modo de ejemplo:

- En anticuerpo primario de ratón (CyclinA):

15 Goat-anti-Mouse IgG Plus (Biocare Medical, Cat# GM601 MMplus), listo para el uso

- En anticuerpo primario de cabra (HSP90 & Jaw1):

20 Mouse-anti-Goat IgG (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., 205-065-108), a ser diluido con ChemMate Antibody Diluent (DAKO Cytomation S 2022) a 1:50

El tiempo de reacción del anticuerpo secundario es, por ejemplo, de 10 a 20 minutos.

25 Después de varias etapas de lavado y preferentemente etapas de secado subsiguientes, se puede efectuar una etapa de bloqueo, en el que la actividad de peroxidasa endógena es bloqueada conforme al principio de un exceso de H₂O₂ en ausencia de un donante de electrones: un Peroxidazed Blocking Agent (Biocare Medical, Cat# PX968MM). El tiempo de reacción de la reacción de bloqueo es de, por ejemplo, 3 x 5 minutos.

30 Después de varias etapas de lavado y preferentemente etapas de secado subsiguientes, se efectúa entonces la extracción del complejo de avidina-biotina-enzima preformado como reactivo terciario (como enzima se usa: peroxidasa de rábano picante (HRP) o fosfatasa alcalina (AP)) y su depósito de alta afinidad en la molécula de biotina del anticuerpo secundario.

35 El tiempo de reacción del reactivo terciario es, por ejemplo, de 10 a 20 minutos.

Después de varias etapas de lavado y preferentemente etapas de secado subsiguientes, se efectúa entonces la incubación con una solución de substrato cromo henna, en donde se puede usar, por ejemplo, tetrahidrocloruro de 3.3'-diaminobencidina (DAB) (cromógeno DAB (Biocare Medical, Cat# DB851-60)), o neofucsina como cromógeno con formación de un producto de reacción visible de color marrón o rojo. La solución de cromógeno puede comprender preferentemente un medio de tampón (por ejemplo, DAB Substrate Buffer (Biocare Medical, Ref DS854MM); relación del cromógeno al medio tampón de 1:20).

40 El tiempo de reacción del cromógeno es de, por ejemplo, 5-10 minutos.

45 Después de varias etapas de lavado y preferentemente etapas de secado subsiguientes, las zonas de reacción de los portaobjetos pueden ser tratadas para terminar la reacción de coloración con hematoxilina (tiempo de reacción de, por ejemplo, 1 minutos). Las muestras celulares y tisulares en las zonas de reacción de los portaobjetos después pueden ser deshidratadas (serie alcohólica ascendente: 70 %-70 %-96 %-100 % de etanol durante respectivamente 1 minuto) y tratadas con xylol. Los portaobjetos luego pueden ser cerrados con una tapa para su almacenamiento.

50 Los reactivos descritos como ejemplo, así como otros reactivos deseados, se cargan en forma lista para el uso en los depósitos de almacenamiento del cabezal de dosificación, en donde los reactivos dentro de los depósitos de almacenamiento preferentemente se disponen de tal manera que se posibilite una dosificación simultánea de reactivos en función de la respectiva tarea de análisis, de tal forma que se obtengan paneles ventajosos.

55 En la siguiente tabla se muestran modo de ejemplo agrupaciones de respectivamente 6 reactivos (anticuerpos) en paneles, que están coordinados entre sí en algoritmos de coloración y que pueden ser usados ventajosamente para el diagnóstico patológico de las lesiones/tumores respectivamente indicados.

60

Leucemias	Linfoma de células B	Plasmo-citoma	Tumores neuro-endocrinos	KM Ca	Carcinoma de mama	
Precursores I	I	II			I	III
					II	
CD3	CD5	CD20	KL1	KL1 (A1/A3)	CK7	CK5/6
CD34	CD20	CD38	NSE	ER/PR	p63	CK14
CD79	CD23	CD56	TTF1	CK7+8	ER	Calretinin
CD117	Kappa	Kappa	MIB1	CEAp	PR	Synapto
MPO	Lambda	Lambda	Synapto	PSA	Her2neu	Cyclin d1
TdT	Cyclin D1		Ceromo	S100	E-Cadherin	gCDFP

Las abreviaturas indicadas son denominaciones corrientes para los anticuerpos disponibles comercialmente. Dado el caso, los anticuerpos pueden ser diluidos de la manera común y cargados en secuencia definida dentro de los depósitos de almacenamiento del cabezal de dosificación. El panel algorítmico obtenido de esta manera puede ser conectado en un segmento de cabezal de dosificación manipulable por separado, que se inserta de manera separada de otros segmentos del cabezal de dosificación en el soporte del cabezal de dosificación y de esta manera se forma un cabezal de dosificación completo. Para prevenir confusiones, los paneles reunidos en segmentos de cabezal de dosificación preferentemente son rotulados o codificados mecánicamente y/o eléctricamente.

Otros paneles algorítmicos de coloración se incluyen en la tabla 1 presentada más adelante en el texto.

El dispositivo de acuerdo con la presente invención es particularmente apropiado para realizar un procedimiento para la dosificación de reactivos sobre un portaobjetos o dentro de depresiones dispuestas en los portaobjetos, respectivamente.

Para esto, los portaobjetos se colocan en el dispositivo. Preferentemente, los portaobjetos se disponen sobre una o varias bandejas fuera del dispositivo y las bandejas se colocan entonces en el dispositivo. Los portaobjetos preferentemente se sujetan en las bandejas a través de medios de sujeción mecánicos, preferentemente un sistema de sujeción mecánico con elementos de sujeción tipo macho y hembra. Los portaobjetos presentan preferentemente campos de rotulación, sobre los que se pueden fijar medios de identificación, por ejemplo etiquetas con códigos 1D o 2D, chips de RPID o elementos similares. La orientación de los portaobjetos preferentemente siempre es igual, de tal manera que es suficiente una mirada del usuario para verificar si todos los campos de rotulación de los portaobjetos apuntan en la misma dirección.

El único control que debe realizar el usuario en este punto es comprobar si los portaobjetos están colocados con la sección de muestra hacia arriba y si los campos de rotulación de los portaobjetos apuntan todos en la misma dirección. El orden secuencial de los portaobjetos en el dispositivo de acuerdo con la presente invención puede ser cualquiera que se desee, ya que todos los portaobjetos en primer lugar son leídos mediante el escáner integrado. De esta manera, el dispositivo también puede verificar de inmediato si eventualmente se ha colocado un portaobjetos con el que actualmente no coincida ningún panel con reactivos (en el cabezal de dosificación). Por lo tanto, queda excluido así un procesamiento erróneo de dicho portaobjetos. Adicionalmente, se puede calcular una ruta de desplazamiento optimizada para el cabezal de dosificación.

El procedimiento comprende además la carga de los depósitos de almacenamiento del cabezal de dosificación con los reactivos apropiados. La carga del cabezal de dosificación con los respectivos reactivos se lleva a cabo en una estación de carga automática, a la que el cabezal de dosificación puede ser movido con los depósitos de almacenamiento parcialmente o completamente vacíos por medio del dispositivo de posicionamiento. El cabezal de dosificación es sujetado entonces en el sistema de posicionamiento, que preferentemente está configurado como sistema cartesiano, o bien es insertado en el soporte del cabezal de dosificación sujetado al sistema de posicionamiento. El cabezal de dosificación o el soporte del cabezal de dosificación presentan preferentemente un dispositivo de refrigeración que, por ejemplo, está formado por elementos de Peltier. Si el dispositivo comprende una estación de recarga para los reactivos, en la que el cabezal de dosificación es rellenado después de su vaciado, la misma igualmente se carga con los reactivos. A este respecto, preferentemente tanto el depósito de almacenamiento del cabezal de dosificación como también los depósitos de almacenamiento de la estación de recarga se proveen con medios de identificación, a fin de poder vigilar el control automático del análisis, es decir, la dosificación de los reactivos en las depresiones o zonas de reacción, así como la recarga del cabezal de dosificación a través del software. Adicionalmente, se asegura preferentemente que el volumen de reactivos en el cabezal de dosificación o en la estación de recarga se correlacione con el número total de zonas de reacción.

Después de finalizar estos preparativos, se inicia la secuencia de análisis. Para esto, el cabezal de dosificación se desplaza con el aparato lector para los medios de identificación preferentemente primero sobre los portaobjetos, a fin de leer la información en los medios de identificación y para registrar la posición de los portaobjetos y de las depresiones/zonas de reacción dispuestas en los mismos.

A continuación, el cabezal de dosificación comienza a dosificar los reactivos dentro de las depresiones/zonas de reacción, en donde el volumen del reactivo a ser dosificado es menor que el volumen de la depresión/zona de reacción. A este respecto, el cabezal de dosificación efectúa entonces la secuencia de etapas de reacción predeterminada por el respectivo método de análisis, por ejemplo el método ABC previamente descrito, con etapas de lavado intercaladas, etc.

De manera adicional, el procedimiento comprende preferentemente una etapa en la que los portaobjetos o las depresiones/zonas de reacción dispuestas sobre los mismos se recubren con una película de recubrimiento, para guardarlos de forma protegida para otras etapas de análisis posteriores, tales como, por ejemplo, análisis microscópicos.

Breve descripción de las figuras

Una forma de realización especial del dispositivo de acuerdo con la presente invención y del cabezal de dosificación se describe basándose en las figuras adjuntas, en las que:

- 5 La Fig. 1 es una vista superior sobre un portaobjetos que puede ser usado de acuerdo con la presente invención,
 La Fig. 2 es una vista de sección transversal del portaobjetos de la Fig. 1 a lo largo de la línea intermitente A-A,
 10 La Fig. 3 es una vista general en perspectiva de un dispositivo de acuerdo con la presente invención con la tapa cerrada,
 La Fig. 4 es una vista general en perspectiva del dispositivo de acuerdo con la Fig. 3 con la tapa abierta,
 La Fig. 5 es una vista general en perspectiva del cabezal de dosificación del dispositivo de acuerdo con las figuras 3 y 4,
 15 La Fig. 6 es una vista de detalle en perspectiva del cabezal de dosificación de acuerdo con la Fig. 5,
 La Fig. 7 es otra vista general en perspectiva del cabezal de dosificación, y
 La Fig. 8 es una vista del cabezal de dosificación desde abajo.

Descripción detallada de las figuras

20 El portaobjetos 50 mostrado en la Fig. 1 presenta depresiones 52 con una superficie de sección transversal cuadrada que están dispuestas en una matriz regular de 3 x 6. Las depresiones 52 están dispuestas de manera respectivamente equidistante en las filas de 3 y en las columnas de 6, en donde la distancia entre las filas es >entre las depresiones 52 en una misma fila. Las depresiones 52 están provistos respectivamente de una muestra tisular o celular 53, 53a, 53b. Las depresiones 52 forman zonas de reacción 58. El portaobjetos 50 presenta en un extremo un campo de rotulación 51, en el que se puede adherir, por ejemplo, una etiqueta de código 1D o 2D para identificar el portaobjetos 50.

La Fig. 2 es una vista de sección transversal a través de una zona de reacción 58 a lo largo de la línea intermitente A-A mostrada en la Fig. 1. A este respecto, en la Fig. 1 se muestra una depresión cuadrada 52 sin ninguna muestra tisular o celular 53, mientras que en la Fig. 2 para mayor claridad se presenta una muestra tisular o celular 53. La muestra tisular o celular 53 se encuentra dispuesta sobre una película de soporte 56 formada por una película de policarbonato y está adherida mediante un adhesivo sobre la placa de base 55 del portaobjetos 50. El portaobjetos 50, por ejemplo, está revestido con un marco aplicado por pulverización de un material hidrófobo, una película de teflón o una película de otro material hidrófobo (numeral de referencia 54), en donde se proveen las depresiones 52 o las zonas de reacción 58, respectivamente. El marco o la película 54, respectivamente, presenta un espesor d2 que es mayor que la suma d1 de los espesores de la muestra celular o tisular 53 y de la película de soporte 56, de tal manera que la muestra tisular o celular se encuentra dispuesta dentro de la depresión 52 y allí puede ser cargada con reactivos, sin que se produzca una contaminación de las depresiones 52 adyacentes. La relación entre las dimensiones d2/d1 es preferentemente de por lo menos 1,2, en particular de por lo menos 1,3 y de manera particularmente preferente no menor de 1,4. Preferentemente, el volumen de la depresión excede la suma de los volúmenes formados por la muestra tisular o celular 53 y el segmento de película de soporte 56 por lo menos por 1,5 veces y de manera particularmente preferente por lo menos por 2 veces (es decir, el doble).

Si se desea, el portaobjetos 50 antes del comienzo de las reacciones puede proveerse con una película de recubrimiento 57 (con un espesor d3), para asegurar que la muestra celular o tisular 53 no se seque. La película de recubrimiento 57 se retira antes de efectuar las reacciones de comprobación.

La Fig. 3 y la Fig. 4 muestran vistas generales en perspectiva de una forma de realización ejemplar de un dispositivo 10 conforme a la presente invención. El dispositivo 10 está cargado con una pluralidad de portaobjetos 50 que están dispuestos en una matriz regular (12 filas x 8 columna). Los 12 portaobjetos 50 de una columna están sujetos respectivamente sobre una bandeja 51 en forma de listón. Uno de los extremos de la bandeja 51 está configurado de forma rebajable y en el estado rebajado se sumerge en la cubeta de lavado que se encuentra debajo de los portaobjetos 50 dispuestos en un plano. La cubeta de lavado se encuentra dispuesta dentro de la carcasa del dispositivo 10 y no se puede ver en las figuras 3 y 4.

55 Detrás de la tapa 18 se encuentran conexiones para la carga y descarga de líquido de lavado. El dispositivo 10 puede ser cerrado en la parte superior con una cubierta transparente 15, por lo que en el espacio de reacción 19 por encima del plano de los portaobjetos 50 se forma un espacio húmedo, por el que se asegura una humectación continua de las muestras celulares o tisulares 53 en las zonas de reacción de los portaobjetos 50. La cubierta 15 en la Fig. 3 se muestra en estado cerrado y en la Fig. 4 en estado abierto.

60 El dispositivo 10 presenta además un cabezal de dosificación 30 que está dispuesto en un brazo de un sistema de posicionamiento cartesiano X/Y 14 y que de esta manera puede ser posicionado encima de los portaobjetos 50. Los dos brazos del sistema cartesiano 14 están apoyados respectivamente en dos lados, por lo que se obtiene un sistema de posicionamiento robusto. El manejo del dispositivo se efectúa a través del panel de mando 17.

65

La Fig. 5 muestra una representación en perspectiva del cabezal de dosificación 30 que está insertado en un soporte de cabezal de dosificación 40 que se encuentra sujeto en un brazo del sistema de posicionamiento cartesiano X/Y 14. El cabezal de dosificación comprende una pluralidad de depósitos de almacenamiento 31, que presentan una superficie de sección transversal cuadrada y están dispuestos en una matriz cuadrada (11 x 11). El soporte 40 del cabezal de dosificación 30 está equipado con elementos de refrigeración de Peltier 33 y en el lado orientado hacia el espacio de reacción 19 presenta un lector de códigos de barra 32, con el que se pueden leer las etiquetas de código de barras dispuestas en los campos de rotulación 51 de los portaobjetos 50.

La Fig. 6 muestra el principio de construcción del cabezal de dosificación 30 con depósitos de almacenamiento cuadrados 31 que se encuentran dispuestos en una matriz cuadrada de 12 x 12. El cabezal de dosificación 30 comprende en total 144 depósitos de almacenamiento 31, que respectivamente presentan una sección transversal cuadrada y tienen el mismo volumen. Los distintos depósitos de almacenamiento 31 en ambos lados del cabezal de dosificación están numerados respectivamente en secuencia con los números 1 hasta 12. En la vista de detalle mostrada, la superficie de sección transversal cuadrada de un depósito de almacenamiento 31 se muestra con las longitudes laterales 31a, 31b. En el extremo opuesto de cada depósito de almacenamiento 31 se encuentra dispuesta una válvula de dosificación 33. Estas válvulas de dosificación 33 están reunidas en un bloque de dosificación. Las válvulas de dosificación 33 tienen un dispositivo de descarga para los reactivos que se encuentran dentro de los respectivos depósitos de almacenamiento. A las válvulas de dosificación 33 se conecta un bloque de sensores de flujo 34 para el control de la dosificación. La altura de los depósitos de almacenamiento 31 entre los extremos superiores abiertos, que están provistos de una tapa hermética al gas 32, y las válvulas de dosificación 33 dispuestas en un bloque de dosificación 30 se designa con los caracteres de referencia 31c.

Los depósitos de almacenamiento 31 en el extremo opuesto a las válvulas de dosificación 33 están provistos de una tapa hermética al gas, en donde la conexión para la línea de gas no se muestra en la representación esquemática de la Fig. 6. Mediante el uso de una tapa hermética al gas 32, los depósitos de almacenamiento 31 pueden ser cargados, por ejemplo, con aire comprimido o con un gas inerte. Debajo del bloque de válvulas de dosificación se encuentra dispuesto el bloque 34 con los sensores de flujo para el control de flujo y dosificación.

El bloque de dosificación 30 presenta un campo de rotulación 35, para facilitar el cambio de los cabezales de dosificación 30 en el soporte de cabezal de dosificación 40. En un dimensionamiento ejemplar, el depósito de almacenamiento de la Fig. 6 presenta longitudes laterales 31a, 31b de respectivamente 9 mm y una altura 31c de aproximadamente 45 mm. De esto resulta un volumen de aproximadamente 3,6 ml por cada depósito de almacenamiento 31 y un volumen total del cabezal de dosificación 30 de aproximadamente 525 ml.

Como se muestra en la Fig. 6, el cabezal de dosificación 30 está construido en forma de "sandwich" con placas o bloques sustituibles y presenta una tapa hermética 32, un bloque reunido en forma de unidad de depósitos de almacenamiento 31, un bloque de válvulas de dosificación 34 y/o un bloque de sensores de flujo. Esto proporciona una gran facilidad de mantenimiento y capacidad modular para eventuales ampliaciones.

El cabezal de dosificación 30 mostrado en la Fig. 7 y en la Fig. 8 está insertado en el soporte de cabezal de dosificación 40. El cabezal de dosificación 30 comprende además del control de dosificación 100 también una electrónica 110 para controlar las válvulas del cabezal de dosificación 30 y para controlar las válvulas adicionalmente requeridas 120 para los líquidos que se consumen en mayores cantidades para cada portaobjetos 50. Adicionalmente, la electrónica 110 también comprende un sensor de presión para vigilar la presión del sistema (no mostrados). El escáner 130 mostrado en la Fig. 7 y en la Fig. 8 sirve para reconocer y evaluar los códigos 2D dispuestos en los portaobjetos 50. La tapa 32 está asegurada a través de un mecanismo de cierre 140 dispuesto en ambos lados en la zona superior en su posición cerrada contra una apertura accidental.

Tabla 1: Paneles algorítmicos de coloración para el diagnóstico patológico de los carcinomas indicados.

Precusores y leucemias		Linfoma de células B	Plasmo-citoma		Linfoma de células T	Hodgkin	NLPHD
				klz.Bly +Pz			
I	II	I	II	I+ II			
CD3	CD10	CD5	CD20	CD5	CD3	CD15	CD3
CD34	CD14	CD20	CD38	CD10	CD4	CD20	CD23
CD79	CD56	CD23	CD56	CD20	CD8	CD30	CD57
CD117	KP1	Kappa	Kappa	CD23	CD56	LMP1	EMA
MPO	Glyco	Lambda	Lambda	CD38	CD57		TIA

ES 2 548 585 T3

TdT	Lysozym	Cyclin D1		CD56	TIA	OPD4	OCT2
				CD79			
(CD1a)				Kappa		(CD2)	(CD2)
(CD5)				Lambda		(TIA)	(TIA)
(CD7)				Cyclin D1		(EMA)	(EMA)
(CD19)				MIS			
(CD22)				TdT			
(CD33)							
(CD99)				(CD25)			
(CD123)				(TRAP)			
(IgM)				(IgO)			
(PAX)				(OBA44)			

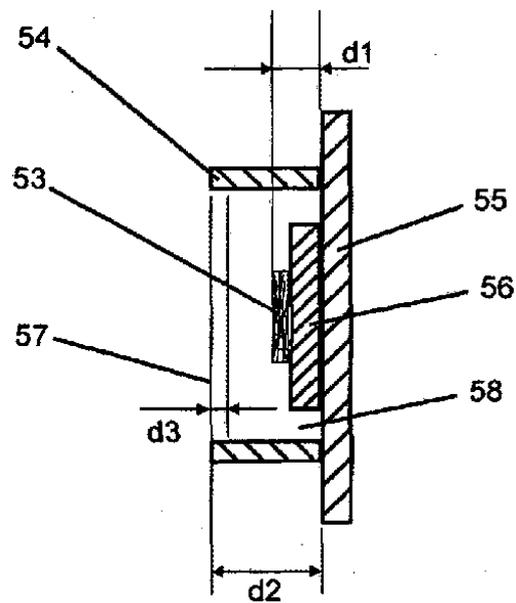
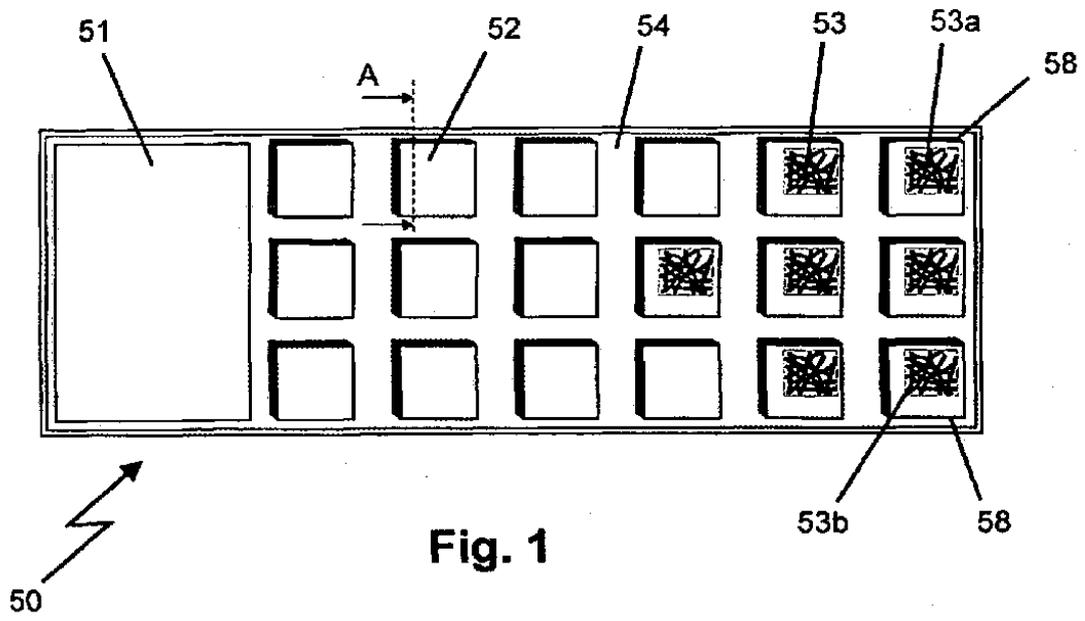
Hg-B		Hg-T		Tumor	Tumor	Ca	
				histiocítico	desconocido		
I	II	I	II			I	II
CD5	CD23	CD3	CD2	CD1a	CD38	KL 1+AE1/3	CDX2
CD10	CD30	CD4	CD8	CD23	GD45	CK5+6	CEA
CD20	CD79	CD20	CD56	S100	CD56	CK10+13	CA19.9
MIB	OCT2	CD30	TIA	KP1	CD138	TTF1	CA12.5
bcl2	IgM	MIS	Granzym	Lysozym	VIM	CK7+8	Calretinin
		ALK	Lysozym		S100(3. KL1	ER+PR	Synapto
(FBER)	(EBER)	(alpha/beta)	(alpha/beta)	(EBER)		(CD14)	
						(Her2neu)	(Her2neu)

Tumores	KMCa	Mama Ca		Tumores	Sarcomas		Tumores
neuroendocrinos				de células germinales			neurógenos
		I	II		I	II	
KL 1	KL 1 (P1/A3)	CK7	CK14	CD30	CD34	CD31	GFAP
NSE	ER	p63	CK5/6	AFP	CD99	EMA	MIB1
TTF1	PR	ER	p53	PLAP	CD117	Demin	S100
MIB1	CEAp	PR	HmFg	EMA	S100	smActin	MAP
Synapto	PSA	Her2neu	Cyclin d1	KL 1	VIM	Myogenin	EMA
Ceromo	S100	E-cadherin	gCDFP	Inhibin	KL 1 (AE1/3)	Calretinin	PR
	CK7+8	CK5/6	Synapto	CD117			
		CK14					
		Calretinin					
		(Her2neu)	(Her2neu)	(NSE)			

REIVINDICACIONES

1. Cabezal de dosificación (30) para el uso en un dispositivo de coloración automático (10) para exámenes en serie en el ámbito de la sanidad para la dosificación de reactivos sobre una pluralidad de portaobjetos (50), que comprende una pluralidad de depósitos de almacenamiento (31) que son apropiados para recibir reactivos líquidos y que en un extremo presentan una válvula de dosificación (33) para la dosificación y aplicación de los reactivos sobre los portaobjetos (50), en donde los depósitos de almacenamiento (31) presentan una cubierta (32) en el extremo opuesto a las válvulas de dosificación (33) y el cabezal de dosificación (30) está formado por placas o bloques sustituibles, en donde la cubiertas (32), los depósitos de almacenamiento (31) y/o las válvulas de dosificación (33) forman respectivamente un bloque unido en forma de unidad, **caracterizado por que** la cubierta (32) es una cubierta hermética al gas (32), en donde la cubierta (32) presenta una conexión provista de válvulas de entrada para la aplicación de una sobrepresión de gas y el volumen medio de los depósitos de almacenamiento (31) es de por lo menos 2,5 ml.
2. Cabezal de dosificación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la salida de descarga de las válvulas de dosificación (33) está dispuesta encima de los agujeros de una placa perforada.
3. Cabezal de dosificación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el cabezal de dosificación (30) presenta un control de dosificación para medir el volumen de los reactivos dosificados, estando el control de dosificación preferentemente formado por sensores de flujo ópticos (34) o por un sistema de medición de flujo capacitivo.
4. Cabezal de dosificación acuerdo con la reivindicación 3, en donde los sensores de flujo (34) están configurados como un bloque unido en forma de unidad.
5. Cabezal de dosificación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el cabezal de dosificación presenta un soporte para recibir conductos de líquido y, en particular, conductos de reactivos de comprobación tales como reactivos secundarios y/o terciarios, presentando el soporte preferentemente válvulas de dosificación y/o un control de dosificación.
6. Cabezal de dosificación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde uno o varios cabezales de dosificación (30) están configurados de tal manera que pueden ser insertados de manera removible en un soporte de cabezal de dosificación (40) del dispositivo automático (10) para la dosificación de reactivos sobre una pluralidad de portaobjetos (50).
7. Cabezal de dosificación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el cabezal de dosificación comprende un dispositivo lector para elementos de identificación fijados sobre los portaobjetos (50).
8. Dispositivo de coloración automático (10) para exámenes en serie en el ámbito de la sanidad para la dosificación de reactivos sobre una pluralidad de portaobjetos (50), que comprende dispositivos de soporte para una pluralidad de portaobjetos (50), que en cada caso comprenden una pluralidad de depresiones delimitadas entre sí (52) que son apropiadas para recibir muestras celulares o tisulares (53), un cabezal de dosificación (30) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 con una pluralidad de depósitos de almacenamiento (31), que son apropiados para recibir reactivos líquidos y que en el extremo orientado hacia las depresiones (52) presentan una válvula de dosificación (33) para la dosificación y aplicación de reactivos en las depresiones (52), y un dispositivo de posicionamiento (14) para posicionar los dispositivos de almacenamiento (31) del cabezal de dosificación (30) sobre las respectivas depresiones (52) de los portaobjetos (50).
9. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 8, en donde los portaobjetos (50) están dispuestos de manera removible sobre una o varias bandejas (51).
10. Dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en donde las bandejas (51) pueden ser colocadas de manera removible en el dispositivo (10).
11. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 10, en donde los depósitos de almacenamiento (31) están dimensionados de tal manera que por lo menos tres, preferentemente seis depresiones adyacentes (52) pueden ser cargadas simultáneamente desde depósitos de almacenamiento (31) con reactivos de comprobación.
12. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 11, en donde la salida de descarga de las válvulas de dosificación (33) están dispuestas sobre los agujeros de una placa perforada.
13. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 12, en donde el cabezal de dosificación (30) comprende sensores de flujo (34) para medir el volumen de los reactivos dosificados.

14. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 13, en donde el dispositivo (10) comprende un soporte de cabezal de dosificación (40), en el que se pueden insertar uno o varios cabezales de dosificación (30).
- 5 15. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 14, en donde el dispositivo (10) comprende una cubeta de lavado dispuesta debajo de los portaobjetos (50) para recibir un líquido de lavado.
- 10 16. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 15, en donde un portaobjetos (50) de manera individual o conjuntamente con otros portaobjetos (50) puede ser transferido desde una primera posición apropiada para la incorporación de los reactivos en la depresión (52) a una segunda posición ubicada dentro de la cubeta de lavado.
- 15 17. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la bandeja (51) que soporta los portaobjetos de manera individual o conjuntamente con otras bandejas (51) puede ser transferida desde una primera posición apropiada para efectuar las reacciones de comprobación a una segunda posición dentro de la cubeta de lavado.
- 20 18. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 17, en donde el dispositivo (10) presenta una estación de carga preferentemente automática, a la que puede ser desplazado por medio del dispositivo de posicionamiento (14) el cabezal de dosificación (30) con los depósitos de almacenamiento (31) parcialmente o completamente vacíos, para recargar los depósitos de almacenamiento (31) con los respectivos reactivos.
- 25 19. Procedimiento para la dosificación de reactivos sobre una pluralidad de portaobjetos (50), en donde se usa un dispositivo de coloración automático (10) para exámenes en serie en el ámbito de la sanidad de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 18, en el que los portaobjetos (50) se colocan en el dispositivo (10), los depósitos de almacenamiento (31), que están configurados como un bloque unido en forma de unidad y en el extremo opuesto a las válvulas de dosificación (33) presentan la cubierta hermética al gas (32), en donde la cubierta (32) presenta una conexión provista de válvulas de entrada para la aplicación de una sobrepresión de gas, se llenan con reactivos, el cabezal de dosificación (30) con ayuda del dispositivo de posicionamiento (14) posiciona depósitos de almacenamiento mutuamente adyacentes (31) sobre por lo menos tres depresiones adyacentes (52) del portaobjetos (50), y los reactivos se dosifican dentro de las depresiones (52), en donde el volumen del reactivo es menor que el volumen de la depresión (52) y en donde por lo menos tres depresiones adyacentes (52) de los portaobjetos (50) son cargados simultáneamente con reactivos desde los depósitos de almacenamiento (31).
- 30 20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que los portaobjetos (52) están marcados con elementos de identificación y el cabezal de dosificación (30) o el soporte de cabezal de dosificación (40) del dispositivo comprenden un aparato lector para leer los elementos de identificación, en donde el cabezal de dosificación (30) recorre los portaobjetos (50) antes de comenzar la dosificación de los reactivos, para leer la información en los medios de identificación y para detectar la posición de los portaobjetos (50) y de las depresiones (52) provistas en los portaobjetos (50).
- 35 40



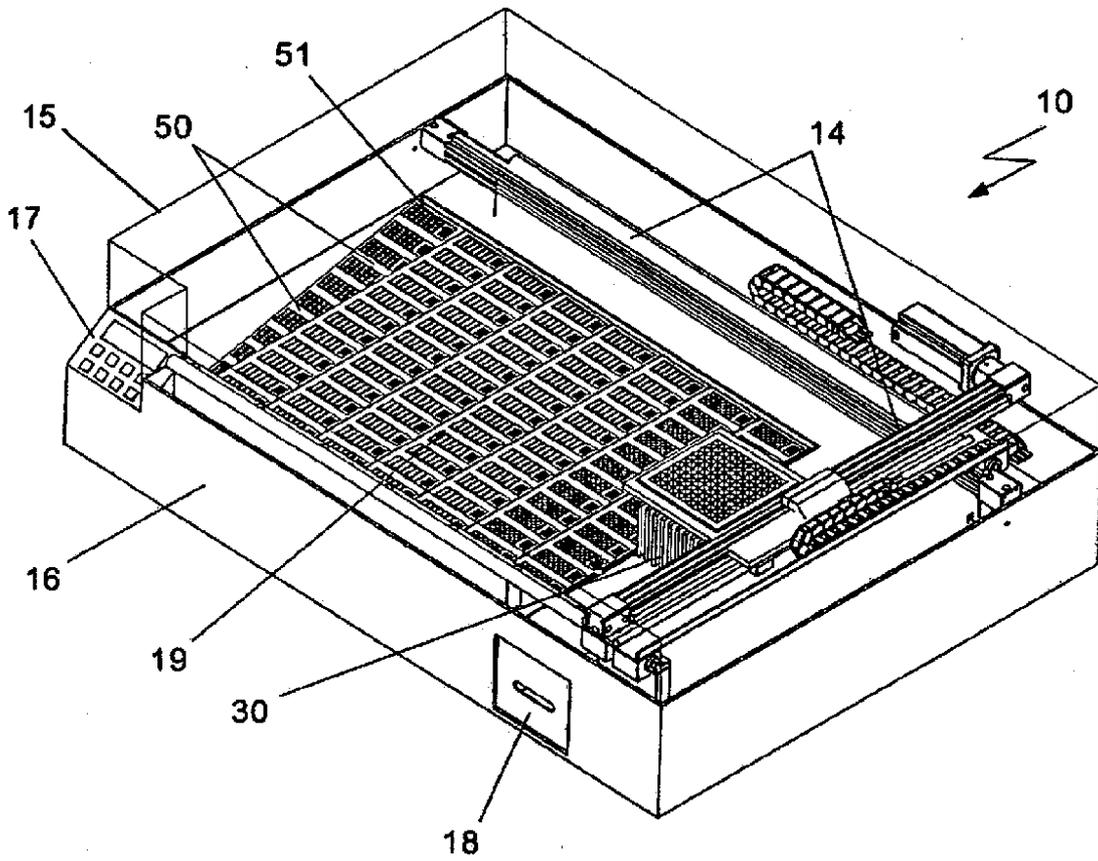


Fig. 3

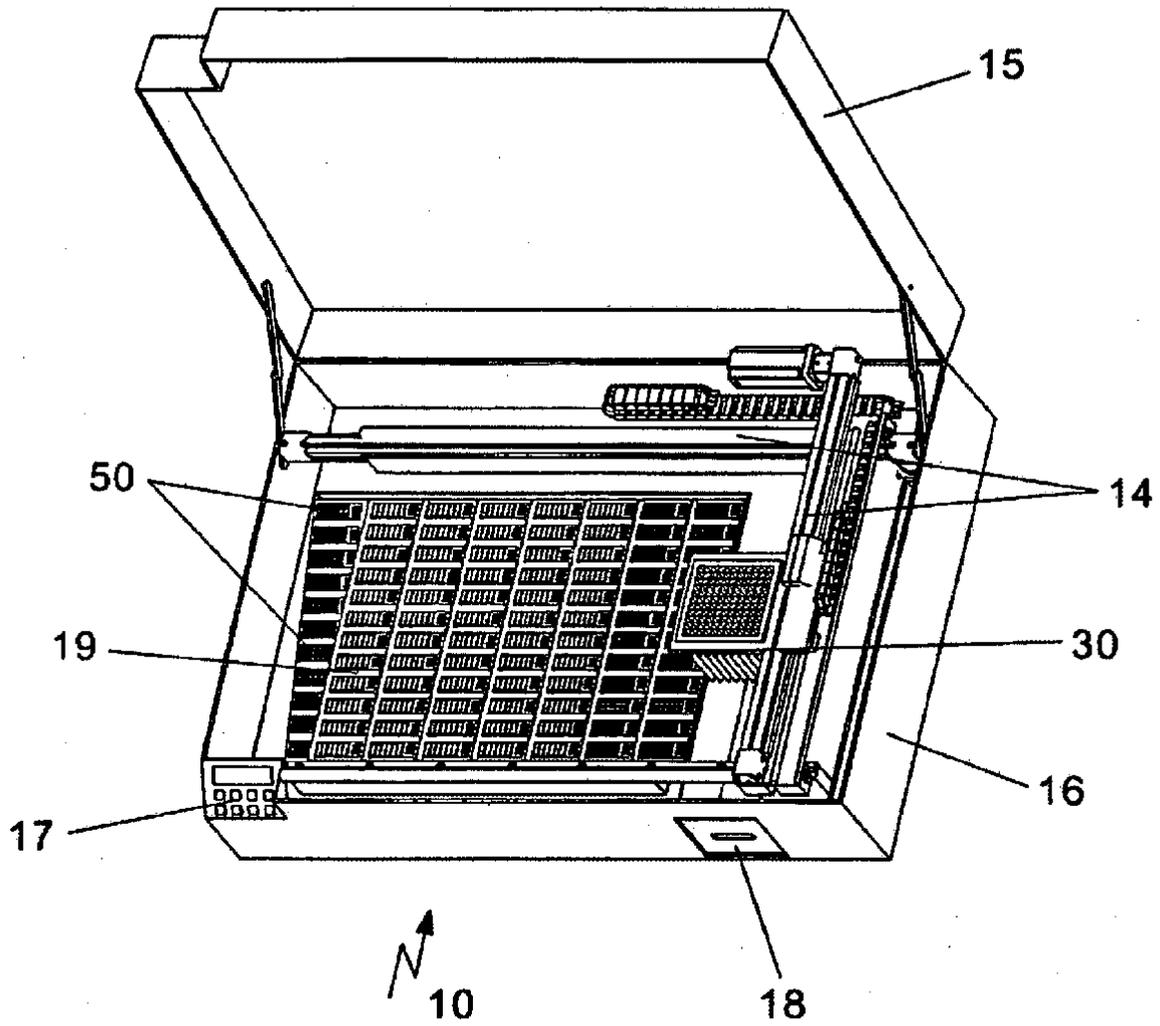


Fig. 4

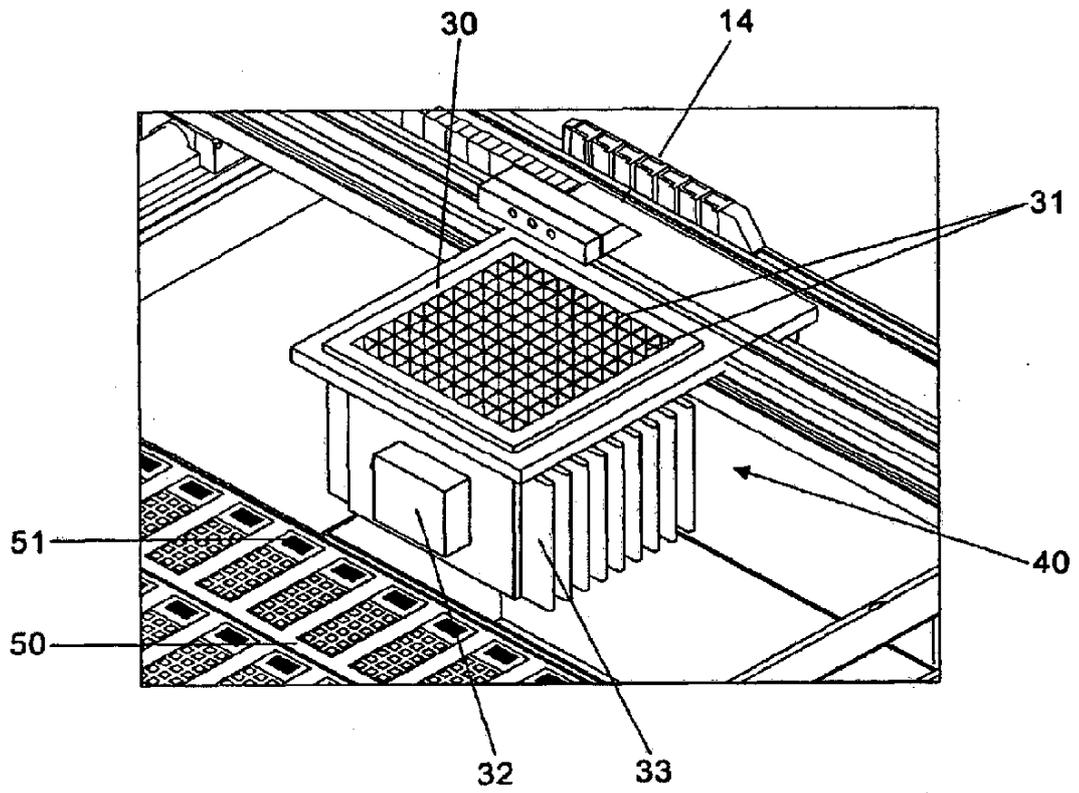


Fig. 5

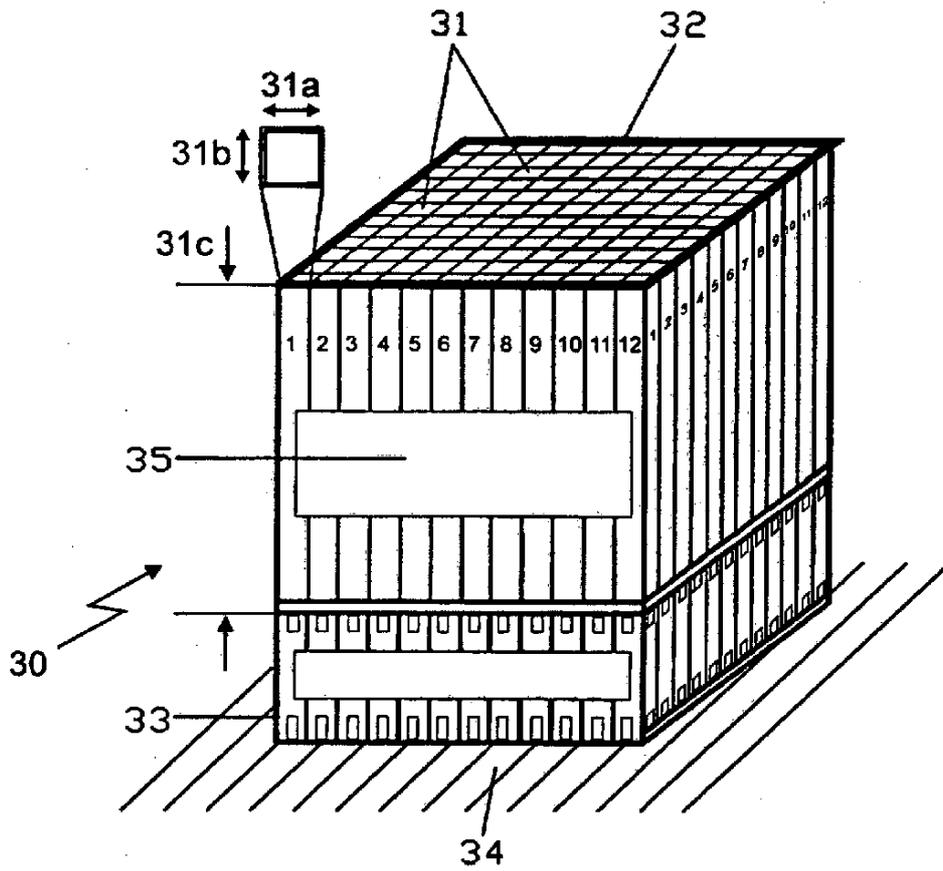


Fig. 6

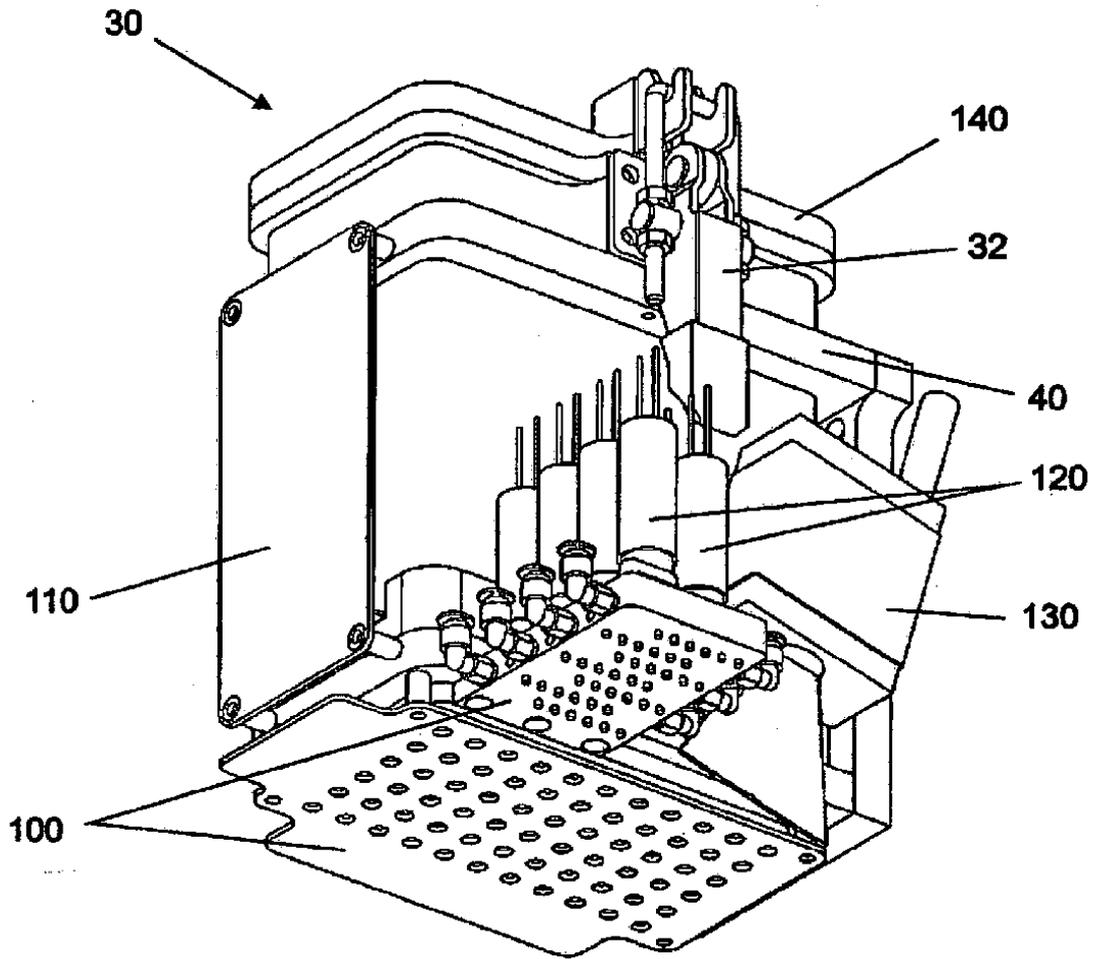


Fig. 7

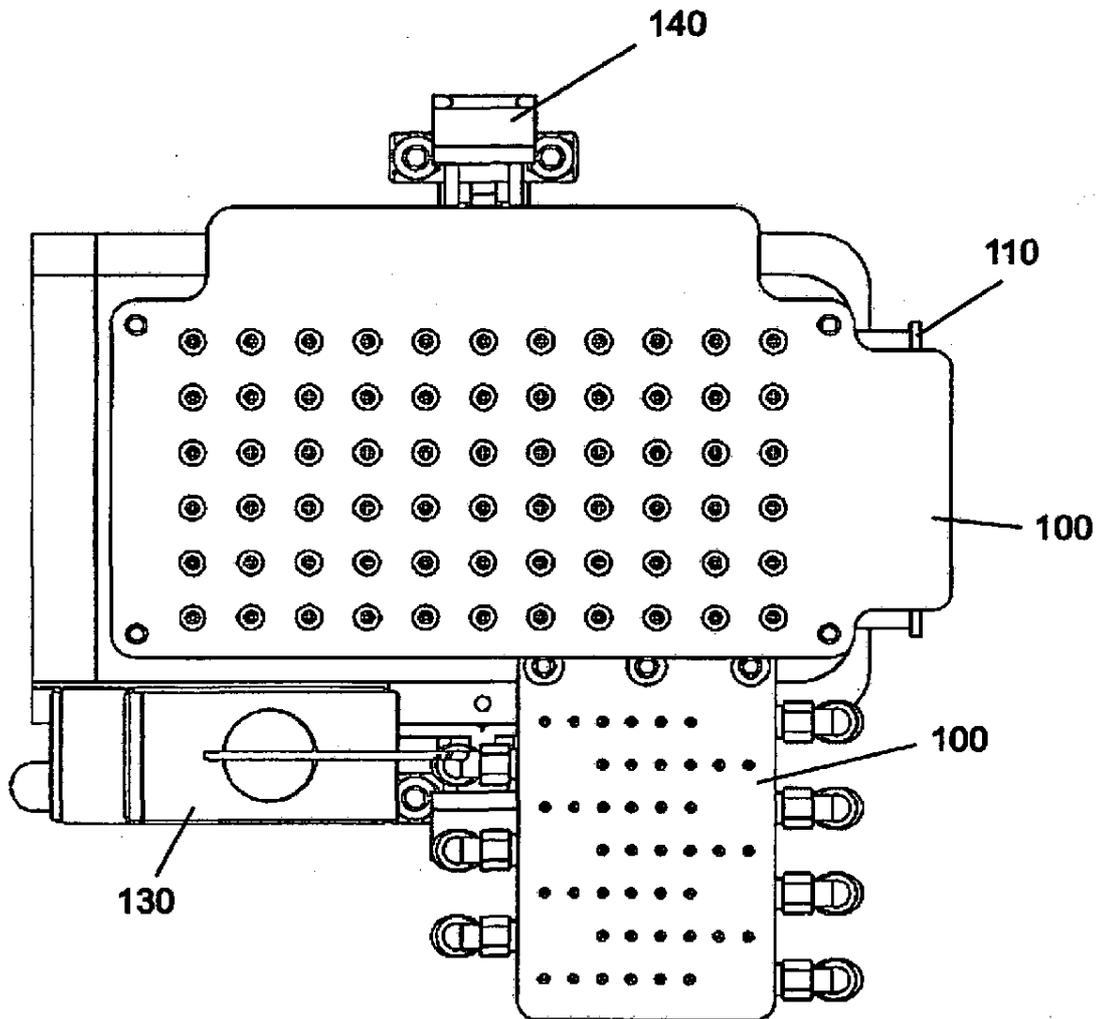


Fig. 8