

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 425**

51 Int. Cl.:

C12M 1/22 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
B01L 7/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 1/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2005 PCT/DK2005/000003**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2005 WO05066327**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2005 E 05700555 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 1711590**

54 Título: **Aparato y métodos para el procesamiento de muestras biológicas y un depósito para los mismos**

30 Prioridad:

08.01.2004 US 535615 P

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

31.05.2017

73 Titular/es:

**DAKO DENMARK A/S (100.0%)
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, DK**

72 Inventor/es:

**TESTA, GREGORY, A.;
POULSEN, TIM, SVENSTRUP;
MATTHIESEN, STEEN, HAUGE;
RASMUSSEN, OLE, FELDBALLE y
WINTHER, LARS**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 614 425 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

Aparato y métodos para el procesamiento de muestras biológicas y un depósito para los mismos

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al campo de sistemas de procesamiento de muestras y métodos de procesamiento de muestras.

Esta invención se refiere a los campos de citología e histología, biología molecular, bioquímica, inmunología, microbiología y biología celular. En particular, la invención se refiere a los campos de citogenética molecular e inmunohistoquímica y, en particular, la presente invención se refiere a un método y un aparato para el procesamiento, tratamiento, o incluso tinción de al menos una muestra biológica alojada en un elemento portador, tal como un portaobjetos de microscopio. En particular, la invención se refiere al control de la humedad y la temperatura durante el procesamiento.

Las aplicaciones con las que puede relacionarse la presente incluyen especialmente hibridación *in situ*, hibridación *in situ* fluorescente, citología, inmunohistoquímica, tinción especial, y micromatrices, así como potencialmente otras aplicaciones químicas y biológicas.

15 **Antecedentes de la invención**

Se han usado técnicas histológicas y citológicas para analizar biopsias y otras muestras de tejido, como una ayuda al diagnóstico y la investigación médica.

La citología es el estudio de la estructura de todos los componentes normales y anómalos de las células y los cambios, movimientos y transformaciones de tales componentes.

20 Las células se estudian directamente en el estado vivo o se destruyen (fijan) y preparan mediante, por ejemplo, sistemas de preparación de capa fina, imbibición, seccionamiento, y/o tinción para la investigación en microscopios de campo claro, de fluorescencia o electrónicos.

La histología es el estudio de grupos de células especializadas denominadas tejidos que se encuentran en la mayoría de plantas y animales multicelulares. La investigación histológica incluye el estudio de la muerte y regeneración celular y de tejidos y la reacción de tejidos y células a heridas, un estado patológico tal como cáncer u organismos de invasión tales como VPH (Virus del papiloma humano). Como el tejido normal tiene un aspecto característico, el examen histológico se utiliza a menudo para identificar tejido enfermo.

Los análisis de hibridación *in situ* (ISH), e inmunohistoquímica (IHC) son herramientas útiles en el diagnóstico histológico y el estudio de morfología de tejidos.

30 La hibridación *in situ* (ISH), inmunocitoquímica e inmunohistoquímica (IHC) buscan identificar una entidad detectable en una muestra usando agentes de unión específicos que pueden unirse a la entidad detectable.

Una muestra biológica debe entenderse en esta solicitud como una muestra biológica tal como muestras histológicas, por ejemplo especímenes de tejidos y células, incluyendo líneas celulares, proteínas y péptidos sintéticos, tejidos, preparaciones celulares, sangre, fluidos corporales, frotis de sangre, extensiones de metafase, médula ósea, especímenes de citología, preparaciones de capa fina, y específicamente muestras biológicas en portaobjetos de microscopio.

La muestra biológica puede seleccionarse además de manera adecuada de material histológico, incluyendo material embebido en parafina y fijado en formalina, material citológico, aspirados de aguja fina, frotis celulares, especímenes citológicos exfoliativos, preparaciones táctiles, especímenes de médula ósea, muestras de esputo, expectoraciones, hisopos orales, hisopos de laringe, hisopos vaginales, aspirados bronquiales, lavado bronquial, lavado gástrico, sangre, orina, y fluidos corporales. Éstos pueden someterse a diversos tratamientos.

La muestra biológica también puede seleccionarse de manera adecuada de fuentes no humanas, incluyendo hisopos de virus y hongos, muestras tomadas de equipos médicos, muestras veterinarias y alimentos. También pueden tomarse muestras de pelo, órganos, semen y células ováricas así como células cultivadas *in vitro*. Las muestras biológicas son preferiblemente de tejidos vivos o post mortem de Homo sapiens, pero no se limitan a células eucariotas. Los ejemplos incluyen detección de organismos procariotas, tales como *Escherichia coli 0157* en agua potable.

Los portaobjetos pueden ser cualquier soporte sólido o semisólido adecuado para la muestra biológica. En particular, el soporte puede ser un portaobjetos de microscopio, una micromatriz, una membrana, un filtro, un portaobjetos polimérico, un portaobjetos de cámara, una placa, o una placa Petri.

La presente invención se refiere especialmente- pero no exclusivamente- a la hibridación *in situ* (ISH). A continuación se describe en más detalle la ISH.

La ISH es un método diagnóstico para la caracterización y evaluación de genes, cromosomas, células, agregados celulares, tejidos y otras muestras biológicas.

5 La ISH puede usarse para evaluar y caracterizar el estado, anomalías genéticas y otros estados patológicos, tales como cáncer o enfermedad, provocadas por organismos infecciosos. Además, puede usarse para caracterizar células con respecto a agentes infecciosos tales como, pero no limitados a, VPH, VIH (virus de inmunodeficiencia humana) y VCH (virus de la hepatitis C).

10 Los acontecimientos genéticos moleculares, tales como aneuploidía, amplificación de genes, delección de genes, expresión de ARN, transporte de ARN, locación de ARN y translocaciones, duplicaciones, inserciones, o inversiones de cromosomas que son difíciles de detectar con análisis del cariotipo, PCR, o LCR pueden caracterizarse mediante ISH.

Las técnicas de ISH pueden tener el potencial de aumentar las posibilidades de supervivencia de pacientes con cáncer haciendo posible la detección más temprana de malignidad y valoraciones pronósticas más precisas tras cirugía tumoral. La técnica también puede aplicarse al análisis genético prenatal y postnatal.

15 Además, la tecnología puede usarse para la detección simultánea de múltiples anomalías genéticas en una célula individual, y ahorrar así en tiempo de ensayo y limitar los requisitos de especímenes.

20 Los ejemplos no limitativos de ensayos de ISH diagnósticamente importantes incluyen la detección de HER-2 (también conocido como HER-2/neu o c-erbB2), Topo II (carcinoma de mama), telómeros, EGFr, C-Myc (carcinoma de mama), N-Myc (neuroblastoma); pares de sonda de translocación para BCR/ABL (leucemia mieloide crónica), EWS (sarcoma de Ewing), C-Myc (linfoma de Burkitt, célula T ALL), leucemia mieloide aguda (AML), trastornos mieloproliferativos (MPD), síndrome mielodisplásico (MDS) y sondas centroméricas para cromosomas 17, 7, 8, 9, 18, X e Y.

Otros ejemplos incluyen el análisis del virus de Epstein-Barr, virus del herpes simple y citomegalovirus humano, virus del papiloma humano, virus de varicela-zóster y ARNm de cadena ligera Kappa y Lambda.

25 Aún otros ejemplos incluyen la detección y análisis de muestras de origen no humano, por ejemplo, parásitos transmitidos por alimentos y microbios y virus que causan enfermedades.

Más ejemplos específicos incluyen

30 i) el análisis de HER-2/neu, también conocido como c-erbB2 o HER-2, que es un gen que ha mostrado tener un papel en la regulación del crecimiento celular. El gen codifica para un receptor de superficie celular de transmembrana que es un miembro de la familia de tirosina quinasas. El HER-2 ha mostrado amplificarse en cánceres de mama, ovarios humanos y otros.

ii) El análisis de aneuploidía para los cromosomas 3, 7, 17 y pérdida del locus 9p21 en especímenes de orina de pacientes con carcinoma de células transicionales de la vejiga.

35 iii) Detección y cuantificación del gen de lipoproteína lipasa (LPL) situado en 8p22 y el gen C-MYC situado en la región de 8q24. Dos alteraciones genéticas observadas en células anómalas, tales como muestras de cáncer de próstata, son ganancia de 8q24 y 8p21-22 (LPL) pérdida de heterocigosidad.

iv) Otro ejemplo incluye la identificación y enumeración del cromosoma 8 en células obtenidas de médula ósea. Se ha hecho una asociación entre la trisomía 8 y tanto crisis blástica mieloide como basofilia. La trisomía 8 es una aberración genética prevalente en varias enfermedades específicas como leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mieloide aguda (AML), y trastornos mieloproliferativos (MPD).

40 v) Otro ejemplo incluye el análisis de aneuploidía cromosómica como translocaciones del locus de cadena pesada de la inmunoglobulina (IGH) situado en 14q32 y observado frecuentemente en pacientes con varias enfermedades hematológicas. Estas translocaciones de IGH dan como resultado la regulación por incremento de oncogenes debido a la yuxtaposición de potenciadores de IGH con estos oncogenes.

45 vi) Otro ejemplo incluye la identificación de inv(16)(p13q22) en el que el gen CFBF situado en 16q22 se fusiona al gen MYH11 situado en 16p13, dando como resultado un producto de proteína quimérica detectado en la leucemia mieloide aguda (AML)

50 vii) Aún otro ejemplo incluye detectar virus de papiloma humano (VPH), que son un grupo de virus de ADN pequeños. Hay más de 90 tipos de VPH. La infección por HPV persistente puede dar como resultado cáncer de cuello uterino, y también se ha asociado con otros tipos de cáncer, por ejemplo cáncer de colon. Los tipos de VPH se clasifican según el riesgo asociado con el desarrollo de cáncer de cuello uterino. Quince tipos se clasifican como alto riesgo, y éstos se detectan en más del 99% de todos los cánceres de cuello uterino.

En resumen, la técnica de hibridación *in situ* (ISH) es un método útil para el análisis de células para la aparición de cromosomas, fragmentos de cromosomas, genes y aberraciones cromosómicas como translocaciones, delecciones,

amplificaciones, inserciones o inversiones asociadas con un estado normal o una enfermedad. Además, la ISH es útil para la detección de agentes infecciosos así como el cambio en niveles de expresión de ARN.

Debe entenderse que la ISH incluye por ejemplo hibridación *in situ* fluorescente (FISH), hibridación *in situ* cromogénica (CISH), FISH en hebra, CGH, pinturas y matrices cromosómicas.

5 A continuación se describen en más detalle la técnica y procedimientos de ISH.

La ISH usa sondas de ácido nucleico, diseñadas para unirse o “hibridarse” con el ADN o ARN diana de un espécimen, habitualmente fijado o adherido a una portaobjetos de vidrio.

Pueden usarse ADN, ARN, APN, ANB u otras sondas de ácido nucleico para la técnica de ISH.

10 Las sondas se marcan para hacer posible la identificación del híbrido diana de la sonda mediante el uso de un microscopio de campo claro o de fluorescencia.

La sonda es normalmente un ácido nucleico de cadena sencilla o doble, tal como un ADN o ARN.

Se marca usando marcadores radioactivos tales como ³¹P, ³³P o ³²S, o de manera no radioactiva, usando marcadores tales como digoxigenina, o marcadores fluorescentes, muchos de los cuales se conocen en la técnica.

15 A menudo, el híbrido se analiza adicionalmente con equipos informáticos de formación de imágenes. Como la hibridación se produce entre dos cadenas complementarias de ADN, o análogos de ADN, pueden usarse sondas marcadas para detectar anomalías genéticas, proporcionando información valiosa sobre trastornos prenatales, cáncer y otras enfermedades genéticas o infecciosas.

20 A diferencia de otras pruebas moleculares basadas en ADN, que requieren lisis celular para liberar ácidos nucleicos para el análisis, la ISH permite el análisis de ADN *in situ*, es decir, en su forma nativa, cromosómica dentro de la célula o incluso el núcleo. Esta característica permite el análisis de cromosomas, genes y otras moléculas de ADN/ARN de células individuales.

Para sondas marcadas directamente, los resultados se detectan observando las muestras bajo un microscopio de fluorescencia con filtros apropiados.

25 La detección indirecta, como CISH, demanda etapas de marcaje adicionales, que normalmente requieren estreptavidina o conjugados de anticuerpo-enzima u homólogos marcados con fluoróforos, y etapas de lavado adicionales una vez que la sonda se ha unido a la diana.

Un ejemplo de procedimiento de ISH general incluye una o varias de las siguientes etapas de procedimiento secuenciales:

- Montaje de la muestra biológica sobre portaobjetos
- 30 • Cocción a temperaturas elevadas
- Eliminación de cera o desparafinado si es necesario
- Lavado
- Recuperación de diana a temperatura elevada
- Desnaturalización a temperatura elevada
- 35 • Incubación con reactivos bloqueantes
- Adición de mezcla de sonda a la muestra sobre el portaobjetos.
- Colocación de un cubreobjetos sobre la muestra y la mezcla de sonda y sellado con adhesivo de caucho.
- Hibridación a temperaturas elevadas.
- Lavado a temperaturas elevadas y retirada de cubreobjetos
- 40 • Secado al aire y contratinción
- Visualización según la instrucción para FISH o CISH
- Examen y evaluación en un microscopio

En más detalle, un ejemplo de protocolo de FISH para secciones de tejido embebidas en parafina podrían incluir una

ES 2 614 425 T3

o varias de las siguientes etapas de procedimiento secuencial:

- Corte de secciones tumorales de 2-4 micrómetros de un bloque
- Montaje sobre portaobjetos
- Cocción a 60°C durante 30 minutos
- 5 • Desparafinado usando xileno
- Rehidratación mediante inmersión en mezclas de etanol/agua
- Pretratamiento mediante lavado con tampón acuoso durante 10 minutos a 95°C
- Digestión con pepsina durante 10 minutos a temperatura ambiente
- Lavado repetidamente
- 10 • Deshidratación en una serie de mezclas frías de etanol/agua
- Secado al aire
- Adición de 10 microlitros de mezcla de sonda de ADN o APN marcada de manera fluorescente por portaobjetos
- Sellado con un cubreobjetos de vidrio de 22 por 22 mm y adhesivo de caucho en los bordes
- 15 • Desnaturalización a 82°C durante 5 minutos, directamente seguida de
- Hibridación durante toda la noche (18 horas) a 45°C
- Eliminación del cubreobjetos
- Lavado riguroso a 65°C durante 10 minutos
- Lavado repetidamente con tampón de lavado
- 20 • Deshidratación mediante inmersión en una serie de mezclas frías de etanol/agua
- Secado al aire
- Montaje con 10 microlitros de disolución antidesvanecimiento con DAPI como contratinción
- Sellado con un cubreobjetos
- Examen y evaluación en un microscopio de fluorescencia

25 La mezcla de hibridación es normalmente una mezcla compleja de muchos componentes. Ejemplos no limitativos de componentes incluyen formamida, agua, tritón x-100, Tween 20, tampón Tris o fosfato, EDTA, EGTA, polivinilpirrolidina, sulfato de dextrano, Ficoll, o ADN de esperma de salmón.

La hibridación *in situ* cromogénica (CISH) usa sondas marcadas, que pueden visualizarse mediante el uso de métodos de tinción inmunológica similares a procedimientos de tinción de IHC.

30 CISH tiene algunas diferencias en comparación con técnicas de FISH: Las aberraciones genéticas pueden verse dentro del contexto de morfología de tejido-examen simultáneo de histopatología y resultados de ISH. También, los resultados pueden visualizarse con un microscopio de campo claro estándar, y el colorante cromogénico (por ejemplo DAB) generado sobre el portaobjetos es permanente con poco o ningún desvanecimiento de señales fluorescentes.

35 Además de ISH, la presente invención también se refiere a inmunohistoquímica e inmunocitoquímica.

El ejemplo general de procedimiento de tinción cromogénica inmunohistoquímica (IHC) de imbibición en parafina y fijación en formalina (FFPE) puede implicar las etapas de:

40 Corte y recorte de tejido, fijación, deshidratación, infiltración en parafina, corte en secciones finas, montaje sobre portaobjetos de vidrio, cocción, desparafinado, rehidratación, recuperación de antígeno, etapas de bloqueo, aplicación de anticuerpo primario, lavado, aplicación de conjugado de anticuerpo secundario-enzima, lavado, aplicación de sustrato de cromogénico enzimático, lavado, contratinción, cubrir con cubreobjetos y examen con microscopio.

Tal como se describió anteriormente, el tratamiento de muestra de los portaobjetos es complicado, laborioso y usa muchos reactivos diferentes a varias temperaturas durante periodos prolongados.

5 Debe entenderse que en condiciones normales solamente una pequeña cantidad de reactivos, 200 µl o incluso menos se aplica a la muestra. Por tanto, el reactivo y la muestra se desecan muy fácilmente, especialmente a altas temperaturas y a muy baja humedad relativa.

Muchas de las etapas del procedimiento en el ISH, incluyendo las etapas de desnaturalización e hibridación normalmente se realizan en una cámara de humedad. La cámara de humedad es un recipiente cerrado o semicerrado en el que pueden procesarse y calentarse los portaobjetos.

10 Debe entenderse que la temperatura de procesamiento así como el tiempo de rampa de temperatura- es decir, el cambio de temperatura por unidad de tiempo, es importante tanto para la longitud de protocolo global como para el resultado visualizado posterior.

Además, se ha observado que el resultado de tinción depende fuertemente de la humedad durante el tratamiento de la muestra.

15 También, la morfología puede experimentar desecación durante el tratamiento. Por ejemplo, extensiones cromosómicas se destruyen fácilmente debido a condiciones de desecación.

Durante los cambios de temperaturas el aire por encima de los portaobjetos se expandirá o contraerá. La reducción en la presión durante la bajada de la temperatura extraerá aire del exterior, que puede estar menos saturado con agua en comparación con el aire por encima del portaobjetos. Durante el calentamiento, el aire se presionará fuera del espacio entre el portaobjetos y la tapa. Este aire contendrá humedad, que se escapará del sistema.

20 Por consiguiente, debido a la pluralidad de cambios rápidos y repetidos en temperatura, temperaturas altas durante tiempo prolongado y el pequeño espacio entre los portaobjetos y la tapa, la humedad puede escaparse o bien rápidamente, o bien con el tiempo, del sistema, dando como resultado un cambio en la concentración de los reactivos aplicados a la muestra biológica y por tanto un cambio en el protocolo, o incluso la desecación de la muestra biológica.

25 La humedad absoluta se define como la cantidad de agua en un volumen dado de gas. La humedad relativa es la razón entre la cantidad de agua y la cantidad máxima de agua posible a la temperatura y presión dadas. La cantidad máxima de agua por volumen, y por consiguiente, la humedad relativa, depende fuertemente de la temperatura, tal como se describe mediante la ecuación de Clausius-Clapeyron.

30 Sin la adición de agua en un sistema cerrado, una humedad relativa del 100% a 25°C corresponderá al 16,3% a 60°C y el 3,7% a 95°C, indicando la fuerte dependencia de la temperatura.

Incluso un pequeño cambio de temperatura cambiará la humedad relativa de manera drástica. Por ejemplo, una humedad relativa del 100% a 80°C corresponderá a solamente el 66,7% a 90°C en un sistema cerrado sin adición de humedad.

35 De la descripción anterior, debe estar claro que el control preciso de la humedad, calentamiento y enfriamiento es esencial para obtener, por ejemplo, resultados de ISH coherentes.

En resumen, sin un sistema de humidificación eficaz, el calentamiento de los portaobjetos puede dar como resultado la desecación rápida de los reactivos o la muestra.

Descripción de la técnica anterior

40 Para evitar la desecación de "reactivos" de los portaobjetos, se conoce el uso de varios sistemas de humidificación cerrados diferentes en los laboratorios citogenéticos, patológicos y de investigación durante por ejemplo las etapas críticas de desnaturalización e hibridación.

45 El documento US 6.555.361 da a conocer una cámara de hibridación que contiene un mecanismo integrado para saturar el aire dentro de la cámara cuando se sella, evitando así la desecación de la muestra líquida. La cámara de hibridación se define mediante mitades de tipo mordaza superior e inferior coincidentes que, al juntarse, se sellan mediante una junta tórica y dispositivo de fijación. La cámara está equipada con un depósito de líquido, el líquido del cual servirá para saturar el volumen de aire sellado dentro de la cámara de hibridación. Un ambiente saturado dentro de la cámara evita la evaporación de la muestra. Las figuras ilustran una cámara interior dimensionada para recibir un portaobjetos de microscopio de vidrio. El documento US 6.555.361 sugiere posicionar un pocillo dentro de la cámara para retener el líquido de manera separada de la zona para contener una muestra líquida. Además, se sugiere disponer un material de membrana microporosa en la cámara y específicamente en el pocillo. El control de temperatura y humedad dentro de la cámara durante periodos de calentamiento o enfriamiento rápido no se describe en este documento.

Una caja húmeda o cámaras humidificadas son normalmente recipientes de plástico con una tapa. Las toallitas de

papel mojado con agua se colocan en el fondo de la caja y el exceso de agua se decanta. Los portaobjetos en rejillas pueden colocarse horizontalmente o verticalmente en la caja durante, por ejemplo, hibridación durante toda la noche.

5 Los equipos de laboratorio de caja húmeda caseros típicos incluyen cajas estándar de Tupperware™ o Rubbermaid™ o moldes estándar para tartas con una tapa de cierre estanca. El papel tisú húmedo se coloca en el fondo. Un bastidor o rejilla se coloca sobre los papeles tisú y los portaobjetos se colocan sobre el bastidor o la rejilla antes de cerrar la tapa. La caja húmeda se coloca en un horno convencional o de microondas o sobre una placa de calentamiento durante por ejemplo las etapas de desnaturalización o hibridación.

10 Para controlar adicionalmente el perfil de humedad y de temperatura, la caja húmeda puede aislarse para limitar la pérdida de calor y mantener así la temperatura durante periodos más largos. Una caja aislada como por ejemplo la HybBox™ (InSitus BioTechnologies, Albuquerque, NM, EE.UU.) hecha de poliestireno expandido con una base y una tapa es un intento para controlar adicionalmente la humedad y la temperatura durante por ejemplo la hibridación. Tras la desnaturalización de la muestra biológica sobre portaobjetos en un horno, los portaobjetos se transfieren a la HybBox™, que se cierra de manera estanca. Tras la hibridación, la caja se abre y los portaobjetos se tratan adicionalmente.

15 Para controlar adicionalmente el perfil de temperatura durante el procesamiento general de portaobjetos, varias cámaras de temperatura controlada están disponibles comercialmente. Un ejemplo es el Boekel Slide Moat™ (Boekel Scientific, Feasterville, PA, EE.UU.) que consiste en un bloque de calentamiento de temperatura controlada. Hasta 30 portaobjetos de microscopio estándares pueden calentarse horizontalmente en el bloque de calentamiento. Una tapa de vidrio con sellos se cierra sobre el bloque de calentamiento y los portaobjetos. La colocación de toallitas húmedas sobre el bloque de calentamiento junto con los portaobjetos puede dar una humedad alta.

20 El sistema de desnaturalización/hibridación HYBrite™ (Vysis, Abbott Laboratories, Downers Grove, Illinois, EE.UU.) es otra cámara húmeda de temperatura controlada que se usa ampliamente, especialmente en laboratorios de ISH. Consiste en una placa de calentamiento programable sobre la que se colocan hasta 12 portaobjetos de microscopio. Una tapa se baja sobre la placa de calentamiento y los portaobjetos y cierra el sistema. En cada lado de la placa de calentamiento de portaobjetos, los pocillos o conductos pueden contener agua o toallitas o papeles tisú. La humedad se controla así mediante el uso de papeles tisú o toallitas húmedas. Una vez que los portaobjetos se colocan en el instrumento y se cierra la tapa, pueden realizarse etapas secuenciales de desnaturalización e hibridación de manera automática sin la intervención del usuario.

25 En un intento por controlar adicionalmente la temperatura y evitar fluctuaciones pequeñas de temperatura, el sistema de calentamiento TruTemp (Matrix, Hudson, NH, EE.UU.) usa una tapa calentada además del bloque de portaobjetos calentado. El instrumento consiste en un bloque de calentamiento programable sobre el que se colocan los portaobjetos. La tapa se calienta adicionalmente. La humidificación se proporciona mediante agua añadida a los pocillos integrados en el bloque de calentamiento sobre el que se apoyan los portaobjetos.

30 Normalmente, el usuario puede programar los diversos sistemas húmedos de temperatura controlada comercialmente disponibles con muchos protocolos de tiempo-temperatura desde 0 hasta más de 24 horas y desde temperatura ambiente hasta 100°C.

35 En todavía otro intento de automatizar la temperatura y la humedad durante el procesamiento, se han introducido instrumentos automatizados usando los denominados sistemas de cubreobjetos líquidos (Ventana Medical Systems, Tucson, Az). La desecación de especímenes montados en portaobjetos se ha limitado cubriendo los reactivos y la muestra con un aceite inmiscible. El sistema solamente limita la evaporación, dando como resultado la pérdida de una parte significativa del volumen de reactivo y no es práctico para por ejemplo hibridación en más de 12 horas a temperaturas elevadas.

40 Los instrumentos eliminan varias etapas y reducen el tiempo de trabajo manual requerido durante procedimientos convencionales de ISH realizados por laboratorios citogenéticos, patológicos y de investigación.

Los sistemas manuales que usan hornos y diversos recipientes de plástico dan, en general, todavía los mejores resultados con respecto a tanto la morfología conservada como la eficacia de tinción.

45 Las cajas o cámaras húmedas semi- o completamente automatizadas tienen la ventaja de, por ejemplo, menos trabajo manual y facilidad de uso. Pero ninguna de las cajas o cámaras húmedas semi- o completamente automatizadas ha logrado proporcionar un rendimiento equivalente a o que supere los métodos manuales, con respecto a morfología conservada y eficacia de tinción.

50 El documento JP 10 028576 da a conocer una incubadora transparente de temperatura constante para microscopía. La incubadora consiste en un espacio que puede controlar libremente la temperatura montando placas exotérmicas transparentes cuyas temperaturas se controlan automáticamente a valores asignados mediante un controlador de temperatura en la parte superior y la parte inferior, un orificio de suministro de dióxido de carbono y un puerto de escape para controlar la concentración de gas de dióxido de carbono en el espacio, una cubeta de evaporación para mantener la humedad en el recipiente hecho hermético mediante un relleno de sellado 4. Como resultado, la

incubadora puede ajustarse a varias condiciones de cultivo de células bajo observación microscópica.

5 El documento WO 2004/025273 A1 da a conocer un dispositivo y un método para llevar a cabo de manera optimizada y automatizada técnicas de marcaje inmunológico para tejido seccionado de manera fina. Una placa de soporte que puede moverse de manera automática mediante un dispositivo de transporte controlado por ordenador y sobre el que se colocan varias secciones finas de tejido en pequeñas redes metálicas se sumerge como un molde en un líquido que está compuesto por una disolución de lavado y marcaje y se coloca en varios rebajes dentro de un soporte de objeto. Dicho soporte de objeto también puede moverse de manera automática.

10 El documento US 4.847.208 da a conocer un dispositivo y método para automatizar la tinción inmunohistoquímica de material biológico sobre portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos se colocan sobre una base con la sección de tejido orientada hacia arriba. Una "cámara" que consiste en una caja de plástico rectangular con una puerta articulada superior se fija directamente sobre la sección de tejido. Una junta de caucho sella la superficie de contacto de cámara-portaobjetos. Los reactivos se dejan caer sobre la sección de tejido abriendo la puerta de plástico articulada superior. Cuando se abre la puerta, la cámara se sella lo suficientemente para evitar la evaporación. El control de humedad está estrechamente conectado con la temperatura, tal como se comentó anteriormente, pero no se controla fácilmente.

Ningún sistema conocido ha abordado verdaderamente el problema de tener tanto temperatura uniforme controlable como humedad uniforme y alta sobre los portaobjetos durante un tiempo prolongado.

En resumen, el dispositivo de tratamiento de muestras debería incluir de manera ideal:

- Control de temperatura programable
- 20 • Control preciso de calentamiento y enfriamiento
- Cambio rápido de temperatura
- Independencia del número de portaobjetos tratados
- Humedad alta a cualquier temperatura relevante
- Humedad constante durante periodos prolongados
- 25 • Temperatura y humedad uniformes sobre los portaobjetos

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un aparato para procesar muestras biológicas, que comprende medios para procesar al menos una muestra biológica alojada sobre al menos un elemento portador en una cámara; en el que el aparato comprende: un elemento inferior de la cámara, elemento inferior que está configurado para soportar la al menos una muestra biológica alojada sobre el al menos un elemento portador; y al menos un depósito que puede adsorber y/o absorber y desorber y/o liberar agua, al menos un depósito que está dispuesto dentro de la cámara; y en el que el aparato se caracteriza por: una tapa para la cámara, tapa a la que se une el al menos un depósito y que en una posición cerrada está configurada para cubrir la al menos una muestra de modo que el al menos un depósito no toca la al menos una muestra biológica sobre el al menos un elemento portador, y en el que el elemento inferior incluye una placa de calentamiento de temperatura controlada para controlar la temperatura del elemento portador y de la al menos una muestra biológica sobre el elemento portador, dicha placa de calentamiento está dispuesta debajo del al menos un elemento portador, en el que el al menos un depósito o bien absorbe o desorbe agua y vapor de agua para controlar la humedad relativa dentro de la cámara cerrada a al menos el 80% de humedad relativa, cuando la tapa está posicionada en la posición cerrada, y en el que el depósito es un dispositivo hecho de un material que tiene un área superficial interior alta para absorber y desorber el agua y el vapor de agua. La proximidad del depósito de fluido y la muestra es importante para garantizar que pueda generarse vapor del depósito a una velocidad que puede mantener una humedad relativa alta constante en la cámara formada alrededor de la muestra por las superficies internas del aparato durante un periodo de calentamiento con temperatura que se eleva.

45 La posición preferida del depósito de fluido es en la superficie inferior de la tapa. Esto garantiza la proximidad óptima a las muestras.

En una realización descrita en el presente documento, el elemento de tapa 14 está provisto de medios de soporte, tales como una rejilla, ranuras y/o dedos (no mostrados), que soportan el al menos un depósito de fluido 18, dispuesto para situarse por encima de las muestras biológicas cuando se cierra la tapa 14, cubriendo así el elemento inferior 12, tal como se indica en la figura 2.

50 En una realización preferida, un aparato según la invención se caracteriza porque el depósito está colocado a menos de 5 cm del elemento portador, preferiblemente a menos de 1,0 cm del elemento portador, aún más preferiblemente a menos de 0,50 cm del elemento portador.

- 5 Preferiblemente, un aparato según la invención se caracteriza porque el área superficial macroscópica del depósito adyacente a y/u orientada a la muestra sobre el elemento portador es de más del 10% del área del elemento portador total y, preferiblemente, más del 30% del área del elemento portador total e incluso más preferiblemente más del 60%. La extensión del depósito tiene un papel importante de la misma manera que la proximidad mediante la mejora de la velocidad por la que la humedad relativa puede cambiarse así como la capacidad de mantener una humedad relativa alta asignada durante un periodo de calentamiento rápido con temperatura que se eleva.
- Preferiblemente, la placa de calentamiento comprende además al menos un elemento seleccionado del grupo que comprende un sensor de temperatura, hilos de calentamiento, un calentador inductivo y medios de enfriamiento.
- 10 El procesamiento asignado de una muestra biológica normalmente implica enfriamiento tras un periodo de calentamiento. En una realización preferida, los medios de enfriamiento son elementos Peltier y/o al menos un ventilador.
- 15 En una realización preferida del aparato, este comprende una placa de calentamiento adicional y/o medios de enfriamiento configurados para calentar el depósito, y caracterizado porque la placa de calentamiento para calentar la muestra sobre el elemento portador y los medios adicionales de calentamiento y/o enfriamiento para calentar el depósito se controlan de manera separada, y pueden calentarse a temperaturas diferentes, de modo que el depósito puede estar más caliente que la muestra o viceversa. De este modo, el control de la humedad relativa dentro de la cámara alrededor de la muestra puede mejorarse altamente ya que puede generarse rápidamente una humedad alta elevando la temperatura del depósito, liberando así moléculas de vapor al interior de la atmósfera en la cámara y así alrededor de la muestra (y tal temperatura puede controlarse calentando o enfriando el soporte de la muestra) el vapor puede permanecer en equilibrio con los reactivos y la muestra o puede condensarse sobre la muestra y en la disolución que comprende los reactivos.
- 20 Alternativamente, si se desea una humedad menor, esta puede obtenerse disminuyendo la temperatura del depósito para que el vapor tienda a concentrarse sobre el depósito y se absorba mediante el depósito para que el vapor pueda extraerse de la atmósfera alrededor de la muestra en el caso de que se desee una desecación de la muestra.
- 25 Es una ventaja esencial del nuevo aparato según la invención que se ha hecho posible un control completo de temperatura y humedad en la atmósfera alrededor de la muestra biológica.
- En una realización preferida del aparato, el depósito está conformado como una hoja sustancialmente plana. Preferiblemente, el espesor del depósito es de menos de 1/10 de la longitud, de modo que la superficie exterior (también denominada superficie macroscópica) es grande en comparación con el volumen. Es esencial que el depósito contenga un volumen suficiente de agua, pero es incluso más esencial que la superficie que permite un intercambio de vapor dentro y fuera del depósito sea lo suficientemente grande como para permitir una liberación o absorción rápida de vapor.
- 30 En otra realización preferida del aparato, la tapa, en una posición cerrada, cubre varios portaobjetos colocados sobre numerosas placas de temperatura controlada.
- 35 El depósito puede tener una estructura de superficie curvada y superficies irregulares, tal como una superficie corrugada.
- Preferiblemente, el fluido es agua sustancialmente pura. Alternativamente, el fluido puede ser agua que incluye aditivos, tales como un agente antimicrobiano.
- 40 El agua puede mezclarse con formamida, tampones acuosos, alcoholes, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, N-metilpirrolidona, tampones no acuosos o mezclas complejas que contienen sales inorgánicas, detergentes, tampones de pH, disolventes orgánicos, glicerol y/o aceite.
- Preferiblemente, el depósito es un dispositivo hecho de un material que tiene un área superficial interior muy alta, tal como esponjas artificiales y naturales, y que comprende una pluralidad de cavidades que pueden alojar un fluido. Preferiblemente al menos una parte sustancial de la(s) superficie(s) es hidrófila.
- 45 Preferiblemente, el depósito está hecho de un material del grupo que comprende materiales compuestos y combinaciones de fibras poliméricas, materiales de fibra de vidrio, polímeros porosos expandidos, cerámicas porosas, rockwool™, pulpa de madera, cartón, piel o materiales basados en celulosas.
- 50 Preferiblemente, el depósito está hecho de un material que comprende cualquiera de las composiciones del grupo que comprende polietileno, polipropileno, poliuretanos, polisulfonas, polivinilo, composiciones poliacrílicas, etilenvinilacetato, rayón viscosa, poliestireno, poliestireno macroreticular, polímeros alifáticos o condensados de fenol-formaldehído, epoxi, algodón, polisacárido, polisacáridos modificados, pulpa de madera, carbonato de calcio, geles de sílice, fibra de vidrio, bentonita, perlita y zeolita
- 55 Preferiblemente, el depósito está hecho de un material del grupo que comprende fibras, microfibras, textiles o textiles empenachados tejidos o tricotados, unidos, no unidos poliméricos artificiales o sintéticos. Preferiblemente, el depósito está hecho de un material del grupo que comprende fibras de poliamida, poliéster, poliolefinas y acetato de

celulosa unidas. El material puede estar hecho de combinaciones no tejidas y unidas de microfibras de polipropileno y polietileno modificadas hidrófilas. El material puede estar hecho de haces de fibras u otro material suelto retenido por una pared fina de película.

- 5 Preferiblemente, el material de depósito tiene una densidad de desde 0,050 hasta 1,5 gramos/cm³, preferiblemente, desde 0,075 hasta 0,75 gramos/cm³. Preferiblemente, el material de depósito puede contener al menos un volumen mínimo predefinido de líquido por elemento portador. Preferiblemente, el material de depósito puede contener al menos 10 microlitros (μl) en total por elemento portador, más preferiblemente más de 100 microlitros (μl) en total por elemento portador, tal como más de 200 microlitros (μl) en total por elemento portador, e incluso más de 500 microlitros (μl) en total por elemento portador, y tal como más de 1000 microlitros (μl) en total por elemento portador.
- 10 Preferiblemente, un depósito adicional está dispuesto encima de la tapa fuera de la cámara, depósito adicional que está dispuesto en comunicación de fluido con el depósito y para llenar el depósito (18) con líquido durante el procesamiento de muestras. El depósito adicional puede llenarse fácilmente con agua sin abrir la cámara de hibridación, y el depósito adicional puede estar en comunicación de fluido con el material de depósito a través de conductos finos en la tapa que permiten que el agua salga o fluya lentamente hacia el material de depósito.
- 15 La presente invención ha resuelto el problema de control de humedad de una reacción de ISH o IHC teniendo un depósito de líquido muy cerca de y adyacente a, orientado preferiblemente a, la muestra sobre el portaobjetos. Además, el depósito está diseñado para el intercambio rápido de humedad entre la fase líquida en el depósito y la fase de vapor en el espacio entre el portaobjetos y la tapa.
- 20 Normalmente el soporte de muestra y la cubierta o tapa que forma la cámara alrededor de la muestra puede diseñarse para dejar solamente un espacio pequeño libre entre la muestra y la cubierta o tapa. Minimizando el volumen de la cámara es más fácil limitar la evaporación de la muestra así como controlar el contenido de la atmósfera en la cámara pequeña.
- 25 Preferiblemente, el depósito puede impregnarse con un agente antimicrobiano u otros agentes protectores. Preferiblemente, el tipo, forma y tamaño del material de depósito se selecciona para optimizar propiedades superficiales para coincidir con la tensión superficial del líquido.
- El depósito es un dispositivo que puede contener líquidos, por ejemplo, agua, situado por encima de o adyacente a los portaobjetos y la placa de calentamiento debajo de los portaobjetos. El líquido puede contenerse en el depósito sobre los portaobjetos a pesar de las fuerzas gravitacionales.
- Incluso una rejilla de hilos de acero finos puede proporcionar un depósito para un líquido.
- 30 El material puede seleccionarse para optimizar la energía superficial para coincidir con la tensión superficial del líquido. Las propiedades superficiales del material pueden deberse al material a granel o de tratamientos superficiales químicos, de plasma o de irradiación específicos. Tales tratamientos son bien conocidos para el experto en la técnica de química de polímeros.
- 35 Las áreas superficiales interiores altas puede adsorber y luego desorber una amplia variedad de diferentes líquidos en función del entorno en que se usan. La humedad relativa sobre la muestra en el portaobjetos es una consecuencia de las características de absorción del material de depósito y la temperatura.
- Debido a las opciones de variación, tales como el tipo, las propiedades superficiales, la forma y el tamaño del material de depósito, la porosidad y el tamaño de poro, puede cumplirse el amplio espectro de requisitos de la acción de humidificación.
- 40 La capacidad de retener el agua es esencial, ya que cualquier gota de agua sobre la muestra deterioraría la tinción de la muestra. También es importante una alta cantidad de agua en el depósito para obtener una alta velocidad de intercambio de aire húmedo para mantener la humedad deseada sobre y dentro de la muestra.
- 45 Preferiblemente, el depósito es lo suficientemente rígido y estable y autoportante, y no se desliza o dobla hacia abajo. Además, preferiblemente, el depósito no se hincha o cambia de forma de manera pronunciada durante la desorción o adsorción de líquidos o debido al cambio de temperatura.
- Preferiblemente, los depósitos se colocan a menos de 5 cm sobre los portaobjetos. Preferiblemente, los depósitos se colocan a menos de 1,0 cm sobre los portaobjetos, todavía más preferiblemente a menos de 0,50 cm sobre los portaobjetos.
- 50 Debe entenderse que los portaobjetos y el depósito podrían estar en una posición inclinada o vertical u horizontal. Es la posición del depósito adyacente a y orientado a la muestra sobre el portaobjetos, lo que es esencial. Además, la disposición de los portaobjetos y el depósito podría ponerse al revés, de modo que el depósito estará situado debajo del portaobjetos.
- El área superficial macroscópica (la superficie exterior) de los depósitos orientados hacia los portaobjetos debe preferiblemente ser más del 10% del área de portaobjetos total. Más preferiblemente, el área debe ser más del 30%

del área de portaobjetos total. Incluso más preferiblemente el área debe ser más del 100% del área de portaobjetos total. El área superficial macroscópica de los depósitos debe entenderse como el área exterior de los depósitos y no el área superficial interna de las fibras o cavidades.

5 El depósito está unido a una tapa, que se baja sobre los portaobjetos colocados en una placa de temperatura controlada. Por tanto, los portaobjetos están encerrados en un espacio controlable cerrado, preferiblemente provistos de sensores de temperatura que controlan el clima.

Debe entenderse que la cubierta o tapa podría cubrir uno, dos o varios portaobjetos en la placa de temperatura controlada o las placas de temperatura controlada de manera individual.

10 En otras realizaciones adicionales, el depósito tal como se describe anteriormente, puede además ser de temperatura controlada mediante un dispositivo de calentamiento por encima del depósito. Preferiblemente, se disponen uno o más sensores para detectar la temperatura por encima del/de los portaobjetos.

Si los depósitos están unidos a la tapa y van a cambiarse, se prefiere tener pequeñas asas o pequeñas incisiones en el material para proporcionar una manipulación manual fácil.

15 Preferiblemente, el calentamiento desde debajo del portaobjetos controla la temperatura del portaobjetos y muestra biológica. Aunque debe entenderse que el depósito también podría calentarse. Preferiblemente, esto puede realizarse por hilos de calentamiento eléctricos integrados en el material de depósito o desde una placa de calentamiento en la tapa. Esto aumentará adicionalmente la eficacia de la capacidad del depósito para humidificar el aire sobre los portaobjetos, ya que un depósito precalentado humidificará más fácilmente el espacio sobre los portaobjetos.

20 Debe entenderse además que el depósito podría conectarse a depósitos externos mediante tuberías u otros medios para permitir un aumento de capacidad. Por consiguiente, el depósito puede llenarse fácilmente. También pueden añadirse diferentes líquidos en función de la reacción y el protocolo que define el procesamiento de muestras.

25 Debe entenderse que en algunas aplicaciones, la temperatura puede ser ambiental durante periodos largos. Es decir, los portaobjetos pueden no calentarse hasta por encima de la temperatura ambiental. Esto es relevante para el almacenamiento de portaobjetos durante la noche antes o después de la tinción o para incubaciones expandidas con reactivos.

El depósito puede contener agua, tampones acuosos y agua mezclada con formamida, alcoholes, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, N-metil-pirrolidona, tampones no acuosos o mezclas complejas que contienen sales inorgánicas, detergentes, tampones de pH, disolventes orgánicos, glicerol y/o aceite.

30 Debe entenderse además que el agua podría incluir un agente antimicrobiano, un agente protector de UV u otros agentes protectores.

35 Además, debe entenderse que la composición del agua en el depósito podría no ser la misma que en la fase de vapor, es decir, el vapor en la atmósfera en el ambiente entre el material de depósito y la muestra biológica y reactivos en un portador. Ajustando la composición del agua en el depósito, puede controlarse la composición de los vapores sobre los portaobjetos. Específicamente, a través del ajuste de la temperatura de los componentes líquidos en el depósito, puede influenciarse el contenido en la fase de vapor ambiental. La experiencia ha demostrado que manteniendo una humedad alta cerca al 100% durante el procesamiento relevante, el contenido de agua en la muestra será al final de tal procesamiento (normalmente tras un calentamiento, y enfriamiento y almacenamiento durante la noche) aproximadamente el óptimo para obtener una tinción perfecta de la muestra.

40 Además, debe entenderse que la presente invención se refiere especialmente a instrumentos semi o completamente automatizados. Especialmente se beneficiarán de esta invención instrumentos controlados por ordenador y automatizados programables para manipular y procesar portaobjetos. Puede controlarse la humedad sobre portaobjetos posicionados individualmente o en disposiciones de rejilla o carrusel en instrumentos mediante la presente invención. De hecho, la invención no se limita a cualquier disposición particular de los portaobjetos sobre una plataforma de portaobjetos. Los depósitos pueden posicionarse en una posición estacionaria adyacente a los portaobjetos. Alternativamente, los depósitos o portaobjetos pueden moverse para ser adyacentes entre sí cuando la humedad va a controlarse. El depósito puede ser de uso único, desechable o de uso más permanente en un instrumento semi o completamente automatizado.

45 La tapa puede colocarse adyacente a y preferiblemente orientada al portaobjetos. Preferiblemente, la tapa se coloca sobre el portaobjetos mientras que el portaobjetos se posiciona sobre un dispositivo de calentamiento. Pueden añadirse reactivos u otros líquidos al portaobjetos a través de uno o varios orificios en la tapa.

50 Un dispositivo de dispensación automatizado puede administrar los reactivos. De manera similar, pueden añadirse líquidos al depósito mediante dispositivos de dispensación automatizados en el instrumento.

Además debe entenderse que la presente invención también funcionaría como un calentador de portaobjetos de

microscopio u otros soportes, especificando un tiempo constante y temperatura y humedad uniformes.

5 Otra aplicación que se beneficiaría de la presente invención es la ISH sobre matrices. Las matrices pueden contener miles de manchas o puntos de muestra. Por ejemplo, tejido inmovilizado, material genético, ADN, ADNc o ARN. Los protocolos de procesamiento y visualización se parecen a los protocolos de ISH más tradicionales. De manera similar, el control de humedad es esencial para resultados coherentes.

Las aplicaciones que usan membranas planas o geles, como el usado en transferencias de tipo Western y Northern y tratamiento de geles de electroforesis, se beneficiarán de la humedad y temperatura altamente controladas de la presente invención.

10 La técnica de PCR y LCR solamente se realiza con dificultad *in situ* en muestras montadas sobre portaobjetos. Uno de los problemas es la falta de normalización con respecto a tiempo de rampa de temperatura y control de humedad uniforme. Los procedimientos de PCR o LCR, que incluían cambios repetidos de temperatura durante periodos largos, podrían beneficiarse de la presente invención.

15 Otra aplicación que se beneficiará de la presente invención es la ISH sobre matrices. Las matrices pueden contener miles de machas, puntos, puntos de muestra o muestras de tejido sobre un único portaobjetos pequeño o grande o soporte plano. La uniformidad de tratamiento en todos los muchos puntos con respecto a la temperatura y humedad es particularmente importante para garantizar resultados reproducibles.

20 También debe entenderse que la presente invención podría reducir la humedad. La capacidad del depósito para adsorber humedad de manera eficaz creará un sistema de deshumidificación. Como ejemplo, tal capacidad podría ser deseable cuando se disminuye la temperatura del portaobjetos, lo que implica que algo de vapor en el aire sobre el portaobjetos se liberará como agua y este agua debe eliminarse del aire sobre el portaobjetos. Teniendo el depósito hidrófilo, tal vapor puede adsorberse sobre las fibras hidrófilas.

25 Por ejemplo, usando un depósito seco, con poco o ningún líquido presente, la superficie de área alta elimina el líquido entre el espacio de los portaobjetos y el depósito. Esto dará como resultado la rápida deshidratación de los portaobjetos. Además, la aplicación de calor a los portaobjetos aumentará la velocidad y eficacia del proceso de deshidratación. Por ejemplo, tal como se describió anteriormente, el protocolo de ISH típico incluye una etapa de deshidratación tras la etapa de lavado riguroso. El lavado riguroso está seguido de dos etapas de lavado, por las que los portaobjetos se sumergen en una serie de baños con concentración creciente de etanol y se dejan secar al aire antes de la adición de medio de montaje.

30 Usando un depósito con la capacidad de adsorber líquido, puede reducirse el número de etapas en el proceso. El calor aplicado a los portaobjetos acelerará adicionalmente el proceso. En resumen, un sistema de deshumidificación eficaz puede reducir las etapas y reactivos necesarios para la deshidratación de portaobjetos.

35 La invención se refiere además a un método de procesamiento de muestras biológicas en el que al menos una muestra biológica está dispuesta sobre un elemento portador, para el tratamiento con el fin de preparar la muestra mediante tinción, el método comprende proporcionar un elemento inferior para soportar el elemento portador; unir al menos un depósito que puede absorber y/o adsorber y desorber y/o liberar agua a una tapa y cubrir la al menos una muestra con la tapa de modo que el al menos un depósito no toca la al menos una muestra biológica sobre el elemento portador; controlar la temperatura del elemento portador y la al menos una muestra biológica con una placa de calentamiento dispuesta por debajo del al menos un elemento portador; y mantener sustancialmente al menos el 80% de humedad relativa dentro de la cámara a través de absorción o desorción de agua y vapor de agua, en el que el depósito es un dispositivo hecho de un material que tiene un área superficial interior alta para absorber y desorber el agua y el vapor de agua. Preferiblemente, el método se caracteriza por mantener sustancialmente al menos el 85% de humedad relativa, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% de humedad relativa y lo más preferiblemente el 99-100% de humedad relativa en la atmósfera por encima de la muestra a través de la presencia cercana de un depósito, lleno de agua. Al realizar el método de procesamiento, se prefiere suministrar el depósito con agua tras la disposición de las muestras sobre los elementos portadores. Si la tapa con el material de depósito que comprende el contenido de agua se deja abierta durante un tiempo sustancial, el agua puede salir hacia abajo, fluyendo fuera del depósito. Preferiblemente, la tapa se cierra y posiciona en su posición horizontal normal cuando contiene agua y durante el procesamiento de las muestras.

45 Las experiencias han indicado que la invención es particularmente útil para hibridar una muestra para realizar un análisis en el que ADN es la diana, para VPH, Her-2, Top2A (para hibridar una muestra para realizar un análisis en el que ARN es la diana), para VPH (para realizar análisis de IHC), para p16, familia Her (incluyendo ER/PR fosforilado, MIB-1) y para hibridar una muestra para realizar un análisis del grupo que comprende ISH, VPH, HER 2, HER2 FISH, Topo II, telómeros, EGFr, C-Myc, virus de Epstein-Barr, virus del herpes simple y citomegalovirus humano, leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mieloide agudo (AML), bandeado cromosómico y pinturas.

55 **Breve descripción de dibujos**

La figura 1 muestra una realización preferida de un aparato según la invención con la tapa abierta.

La figura 2 muestra lo mismo con la tapa cerrada.

La figura 3 muestra una vista esquemática de una disposición de elementos portadores sobre un elemento inferior del aparato.

La figura 4 muestra una vista en sección del aparato a lo largo de la línea a-a en la figura 3.

5 La figura 5 muestra una vista en sección del aparato a lo largo de la línea b-b en la figura 3.

La figura 5A es similar a la figura 5 con una placa de calentamiento en la tapa.

La figura 6 muestra una vista en sección similar a la figura 5 de una realización que tiene un depósito externo.

La figura 7 muestra la visualización y teclado numérico del aparato en las figuras 1 y 2.

10 La figura 8 muestra un único portaobjetos de tejido sobre una placa de calentamiento, cubierto por un depósito según la invención.

Las figuras 9 y 10 muestran una versión manual del aparato en las figuras 1 y 2.

La figura 11 muestra un localizador de portaobjetos que ayuda en la localización de los portaobjetos sobre el elemento inferior de un aparato tal como se muestra en las figuras 1, 2, ó 9, 10.

15 La figura 12 muestra una muestra sobre un portaobjetos dispuesto sobre una placa de calentamiento y cubierto mediante un depósito y una tapa.

Las figuras 13 y 14 muestran un aparato similar al aparato en las figuras 9 y 10, pero diseñado para solamente un portaobjetos.

La figura 15 muestra una vista en sección del aparato en las figuras 13-14.

La figura 16 muestra una disposición similar a las figuras 12-14, incluyendo un brazo robótico.

20 **Descripción detallada de los dibujos**

A continuación se describe la invención con detalles adicionales con referencia a los dibujos adjuntos que muestran como ejemplos no limitativos realizaciones preferidas del aparato según la invención.

25 La figura 1 ilustra como ejemplo una realización de un aparato 10 según la presente invención. El aparato comprende un elemento inferior 12 y un elemento de tapa 14. Preferiblemente, el elemento inferior 12 y el elemento de tapa 14 están conectados a través de una articulación, que no se muestra. En la posición cerrada ilustrada en la figura 2 los dos elementos proporcionan una cámara cerrada o al menos semicerrada.

30 Una pluralidad de muestras biológicas sobre elementos portadores 15 pueden disponerse sobre el elemento inferior 12, por ejemplo, tal como se muestra en las figuras 3 y 11. Normalmente las muestras pueden ser muestras de tejido sobre portaobjetos de microscopio 15. Un aparato de este tipo se fabrica y vende por StatSpin, MA, EE.UU. y por DakoCytomación, Dinamarca A/S.

35 El elemento inferior 12 incluye una placa de calentamiento de temperatura controlada 16, tal como se ilustra en la figura 4. La placa de calentamiento 16 puede estar hecha de material conductor térmico tal como un metal, por ejemplo, tal como cobre. Alternativamente podría ser un polímero conductor térmico. La placa de calentamiento incluye medios de calentamiento (no mostrados) tal como hilos de calentamiento para calentamiento eléctrico, así como medios sensores para detectar la temperatura. Tal regulación de temperatura se conoce bien y no describirá con detalles adicionales en el presente documento. Preferiblemente, también se proporcionan medios de enfriamiento (por ejemplo, elementos Peltier y/o ventilador(es) que soplan aire), para permitir un perfil de temperatura en rampa. El resultado final del tratamiento de muestra puede ser muy dependiente de un perfil de temperatura optimizado exacto, que requiere que la temperatura pueda cambiarse rápidamente según los requisitos definidos en un protocolo para el tratamiento de las muestras biológicas dispuestas en la actualidad en el aparato.

40 Preferiblemente, el elemento de tapa 14 está provisto de medios de soporte, tales como una rejilla, ranuras y/o dedos (no mostrados), que soportan dos tiras de control de humedad 18, dispuestas para situarse por encima de las muestras biológicas cuando se cierra la tapa 14, cubriendo así el elemento inferior 12, tal como se indica en la figura 2. Las tiras 18 actúan como depósitos de agua que garantizan una presencia de agua dentro del aparato cerrado durante el tratamiento de las muestras biológicas. Las tiras pueden unirse mediante cualquier tipo conocido de uniones o medios de adhesión, o pueden integrarse en la tapa o cubierta 14, tal como se indica en las figuras 4-6.

45 En una realización preferida, el elemento de tapa 14 puede estar provisto de medios adicionales de calentamiento y/o enfriamiento 16a (figura 5A), así como medios de detección de temperatura. Preferiblemente, se dispone una unidad de control de temperatura en el aparato para permitir el ajuste de la temperatura de la tapa a un valor diferente de la temperatura seleccionada para el elemento de calentamiento 16 en el elemento inferior 12 para

50

acelerar una liberación o absorción de vapor de la cámara. Esto podría ser específicamente relevante durante una fase de calentamiento o enfriamiento rápido del procesamiento de muestra durante la que la humedad relativa puede ser difícil de controlar sin este calentamiento o enfriamiento adicional del depósito de agua.

5 En una realización adicional el elemento de tapa 14 puede estar provisto de un depósito adicional 28 (figura 6) que permite rellenar con líquido durante el procesamiento de muestra.

10 Es esencial que las tiras 18 tengan superficies interiores grandes en comparación con sus superficies exteriores así como con su volumen total. El material puede ser de un tipo que comprende poros, que forman las cavidades que alojan el agua. Sin embargo, en la actualidad se prefiere que las cavidades estén formadas por espacios entre fibras unidas situadas aleatoriamente, que tienen preferiblemente propiedades hidrófilas. Las tiras o depósitos 18 pueden hacerse de numerosos materiales diferentes, los ejemplos no limitativos incluyen materiales compuestos y combinaciones de fibras poliméricas, materiales de fibra de vidrio, polímeros porosos expandidos, cerámicas porosas, rockwool™, pulpa de madera, cartón, piel o materiales a base de celulosas.

15 Los ejemplos no limitativos incluyen materiales que contienen polietileno, polipropileno, poliuretanos, polisulfonas, polivinilo, composiciones poliacrílicas, etilenvinilacetato, rayón viscosa, poliestireno, poliestireno macrorreticular, polímeros alifáticos o condensados de fenol-formaldehído, epoxi, algodón, polisacárido, polisacáridos modificados, pulpa de madera, carbonato de calcio, geles de sílice, fibra de vidrio, bentonita, perlita o zeolita. Los materiales preferidos incluyen fibras, microfibras, textiles o textiles empenachados tejidos o tricotados, unidos, no unidos poliméricos artificiales o sintéticos. Más preferiblemente, los materiales están hechos de fibras de poliamida, poliéster, poliolefinas y acetato de celulosa unidas.

20 En la realización preferida en la actualidad las tiras 18 son placas apaisadas de combinaciones no tejidas y unidas de microfibras de polipropileno y polietileno modificadas hidrófilas. Preferiblemente, el material tiene una densidad de desde 0,050 hasta 1,5 gramos/cm³, preferiblemente desde 0,075 hasta 0,75 gramos/cm³. Esta composición proporciona las tiras con superficies interiores extremadamente grandes. Las propiedades hidrófilas permiten que las superficies interiores se adhieran a gotas de agua muy pequeñas, proporcionando una superficie muy grande de agua frente a aire, permitiendo y mejorando así un intercambio rápido y el equilibrio entre la fase líquida y la fase de vapor del agua.

25 Preferiblemente, el área superficial macroscópica de las tiras (depósito) orientada hacia el elemento portador con la muestra, es de más del 10% del área del elemento portador total, y preferiblemente más del 30% del área del elemento portador total, incluso más preferiblemente más del 50% del área del elemento portador total, y en la realización más preferida más del 80% del área del elemento portador total.

30 En una realización preferida en la actualidad, las tiras tienen un espesor de aproximadamente 2 mm, una anchura de aproximadamente 28 mm y una longitud de aproximadamente 250 mm. Esta estructura proporciona una superficie grande de la tira orientada a la superficie de la muestra a una distancia corta de la muestra. Preferiblemente, la tira de control de humedad está situada cerca de la muestra para mejorar el intercambio rápido y el suministro de aire húmedo. Preferiblemente, las tiras pueden contener más de 10 microlitros en total por portaobjetos, más preferiblemente, más de 200 microlitros en total por portaobjetos, y todavía más preferiblemente, más de 500 microlitros en total por portaobjetos, e incluso más preferiblemente, más de 1000 microlitros en total por portaobjetos.

35 Montando las tiras de control sobre la superficie interior de la tapa y preferiblemente directamente por encima de los soportes de muestra, se minimiza la distancia desde las tiras hasta la muestra. Normalmente la distancia puede ser de 1 ó 2 mm o incluso menos, pero siempre superior a cero para que una capa de aire y vapor separe la tira de la muestra. La tira de control no debe tocar la muestra.

40 En una realización ventajosa adicional, las tiras pueden tener una estructura de superficie curvada y superficies irregulares, tales como una superficie corrugada. Por tanto, la superficie exterior que comprende aberturas a las superficies interiores se hace grande, mejorando un intercambio rápido de vapores, más específicamente aire y vapor de agua proporcionando caso el 100% de humedad relativa.

45 En todavía otra realización ventajosa adicional, las tiras pueden haberse impregnado con un agente antimicrobiano, un agente protector de UV u otros agentes protectores.

50 En la realización preferida en la actualidad, el depósito se sitúa por encima de la muestra sobre el elemento portador para que el suministro de agua esté ayudado por la gravitación.

55 Tal como se explicó anteriormente, una humedad alta es esencial para el resultado final de la tinción de las muestras biológicas. La presencia de agua es esencial para mantener una humedad alta. El tratamiento de las muestras incluyendo varios cambios de temperatura posiblemente rápidos requiere un intercambio rápido entre la fase líquida y la fase de vapor del agua para garantizar el mantenimiento de una alta humedad relativa en la atmósfera sobre las muestras. Tal alta humedad relativa puede mantenerse a través del uso del aparato según la invención que incorpora las tiras 18.

En la realización preferida en la actualidad, las tiras están hechas de materiales seleccionados por sus propiedades hidrófilas. Más específicamente el tipo, el tamaño y la forma del material de depósito debe seleccionarse para optimizar las propiedades superficiales para coincidir con la tensión superficial del líquido.

5 El aparato comprende medios de procesamiento de datos así como medios de entrada y salida de datos, tales como un teclado o teclado numérico y un medio de visualización 20 en las figura 1 y 7, o está adaptado para la comunicación con un ordenador, tal como un PC. Los medios de procesamiento de datos pueden recibir una entrada de los medios de detección de temperatura y deben poder proporcionar señales de control a los medios de calentamiento y/o enfriamiento.

10 El ordenador puede estar provisto de software e instrucciones que permiten un control automático de temperatura y humedad dentro del aparato según protocolos que especifican las condiciones, por ejemplo, temperaturas y tiempos, para el tratamiento de las muestras. Las figuras 9 y 10 muestran una versión manual del aparato, similar al aparato en las figuras 1 y 2, pero sin control asistido por ordenador.

Los siguientes ejemplos muestran cómo usar la realización preferida de un aparato automático:

Ejemplo A: Encendido de la unidad

15 Después de que un usuario se asegure de que la unidad se ha enchufado a una toma de corriente apropiada, el usuario mueve un interruptor de alimentación (no mostrado) a su posición de “ENCENDIDO”. El instrumento entonces emite un pitido audible para anunciar que la alimentación se ha encendido, empezará un ventilador de enfriamiento y calentamiento (no mostrado) y un Menú Principal tal como se muestra en la tabla I se muestra en los medios de visualización 22, cuando la placa de calentamiento en el instrumento ha alcanzado una temperatura por defecto de 37°C.

Tabla I

Ejecutar un PGM
Editar un PGM
Crear un PGM

Ejemplo B: Programa de desnaturalización e hibridación

25 Después de que se muestre la pantalla de Menú Principal, un cursor en el menú resalta la línea de “Ejecutar un PGM” del menú. El usuario entonces presiona una tecla “Enter” de los medios de entrada y salida 20 para aceptar este elemento del menú. Posteriormente, usando las teclas de flechas, el usuario se desplaza por los diversos números de programa o nombres de programa. Para aceptar la selección de un programa, el usuario presiona el botón o tecla “Enter” de los medios de entrada y salida 20. La visualización 22 confirma entonces el número/nombre de PGM y tiempos y temperaturas de desnaturalización e hibridación, un ejemplo del cual se muestra en la tabla II.

30 El cursor resalta la línea de “Ejecutar PGM”. El usuario presiona entonces el botón “Enter” o tecla para aceptar esta elección.

Tabla II

PGM 01 Her2
82°C :05; 45°C 20:00
Ejecutar PGM
Menú Principal

35 La visualización 22 entonces indica al usuario “Añadir portaobjetos y cerrar tapa” tal como se ilustra en la tabla III. Antes de añadir portaobjetos, el usuario inserta dos tiras de control de humedad 18 en la tapa de portaobjetos interior. Tras la inserción de tiras y tras añadir los portaobjetos, el usuario satura las tiras 18 con agua destilada o equivalente (aproximadamente 13 ml para tiras secas). El cursor entonces resalta la línea “Comenzar”. El usuario presiona el botón “Enter” o tecla para ejecutar el programa.

ES 2 614 425 T3

Tabla III

PGM 01 Her2
Añadir Portaobjetos - Cerrar Tapa
Comenzar
Menú Principal

5 Para volver al Menú Principal, el usuario mueve el cursor para resaltar la línea "Menú Principal" de la visualización 22 y presiona el botón o tecla "Enter". La visualización indica "calentamiento" y la temperatura actual de los portaobjetos. Una vez que la temperatura alcanza un valor de consigna de desnaturalización, el tiempo de desnaturalización se descontará a partir del tiempo establecido tal como se muestra en la tabla IV.

Tabla IV

PGM 01 Her2
Desnat en proceso
Desnat: 82°C 02:28
Temp. actual: 82°C

El aparato comenzará entonces a enfriarse automáticamente hasta la temperatura establecida de hibridación una vez que se complete la desnaturalización (tabla V).

10

Tabla V

Por favor espere
Enfriamiento hasta Hib 45°C
Temp. actual: 58°C

15

El tiempo de hibridación comenzará entonces a descontarse del tiempo establecido una vez que la temperatura alcance un valor de consigna de hibridación. Al finalizar el programa, la unidad emitirá un pitido audible para alertar al usuario y la visualización mostrará "Proceso Completo" tal como se muestra en la tabla VI. La temperatura de hibridación se mantendrá hasta que se acepte una selección de menú de "Finalizar PGM/Menú Principal" presionando el botón "Enter" de los medios de entrada y salida 20. Antes de presionar el botón "Enter", el usuario puede retirar los portaobjetos para el procesamiento adicional. Si no se acepta la selección de "Finalizar PGM/Menú Principal" en el plazo del primer minuto tras la finalización del programa, el tiempo de hibridación comenzará a contar el tiempo total a la temperatura de hibridación.

20

Tabla VI

PGM 01 Her2
PROCESO COMPLETO
Tiempo Total Hib 21:05
Finalizar PGM/Menú Principal

25

Ejemplo C: Ejecutar un programa de solamente hibridación

Tras presentarse visualmente la pantalla de Menú Principal, un cursor en el menú resalta la línea "Ejecutar un PGM" del menú. El usuario presiona entonces una tecla "Enter" de los medios de entrada y salida 20 para aceptar este elemento de menú. Posteriormente, usando las teclas de flechas, el usuario se desplaza por los diversos números de programa o nombres de programa. Para aceptar la selección de un programa, el usuario presiona el botón o tecla "Enter" de los medios de entrada y salida 20. El usuario selecciona un programa de solamente hibridación y la

visualización 20 confirma entonces el número/nombre de PGM y tiempos y temperaturas para un protocolo de solamente hibridación, ejemplos del cual se muestran en la tabla VII. El cursor resalta la línea de “Ejecutar PGM”.

Tabla VII

PGM 02 VEB
Hib: 55°C 01:30
Ejecutar PGM
Menú Principal

- 5 El usuario instala entonces dos tiras de control de humedad 18 en la tapa de portaobjetos interior. Tras la instalación de tiras y tras añadir los portaobjetos, el usuario satura las tiras 18 con agua destilada o equivalente (aproximadamente 13 ml para tiras secas). El cursor entonces resalta la línea “Comenzar” y el usuario presiona el botón o tecla “Enter” para ejecutar el programa tal como se muestra en la tabla VIII.

Tabla VIII

PGM 02 VEB
Añadir Portaobjetos - Cerrar Tapa
Comenzar
Menú Principal

10

El instrumento calentará los portaobjetos hasta la temperatura de hibridación, tal como se indica en la tabla VIIIa.

Tabla VIIIa

Por favor espere
Calentamiento hasta Hib 55°C
Temp actual: 45°C

- 15 Una vez que se ha alcanzado la temperatura de hibridación, la visualización cambia tal como se muestra en la tabla VIIIb y el tiempo se descontará del tiempo establecido.

Tabla VIIIb

PGM 02 VEB
Hib en proceso
Hib 55°C 01:30
Temp. actual: 55°C

- 20 Al finalizar el programa, la unidad emitirá un pitido audible para alertar al usuario y la visualización 22 muestra el mensaje “Proceso Completo” (tabla IX). La temperatura de hibridación se mantendrá hasta que se acepte la selección de “Finalizar PGM/Menú Principal” presionando el botón “Enter”. Antes de presionar el botón “Enter”, el usuario puede retirar los portaobjetos para el procesamiento adicional. Si no se acepta la selección de “Finalizar PGM/Menú Principal” en el primer minuto tras la finalización del programa, el tiempo de hibridación comenzará a contar el tiempo total a la temperatura de hibridación.

Tabla IX

PGM 02 VEB
PROCESO COMPLETO
Tiempo Hib Total 02:15
Finalizar PGM/Menú Principal

Ejemplo D: Programa de temperatura fija

Tras presentarse visualmente la pantalla de Menú Principal, un cursor en el menú resalta la línea “Ejecutar un PGM” del menú. El usuario presiona entonces una tecla “Enter” de los medios de entrada y salida 20 para aceptar este elemento de menú. Posteriormente, usando las teclas de flechas, el usuario se desplaza por los diversos números de programa o nombres de programa. Para aceptar la selección de un programa, el usuario presiona el botón o tecla “Enter” de los medios de entrada y salida 20. El usuario selecciona un programa de temperatura fija. La visualización 20 confirma entonces el número/nombre de PGM y la temperatura fija (tabla X) y el cursor resalta la línea de “Ejecutar PGM” de la visualización 22.

Tabla X

PGM 03 Appl
Fija: 65°C
Ejecutar PGM
Menú Principal

Presionando el botón o tecla “Enter” de los medios de entrada y salida 20 para ejecutar el programa, el instrumento se calentará a la temperatura fija tal como se indica en la tabla XI.

Tabla XI

Por favor espere
Calentamiento hasta fija: 65°C
Temp. actual: 30°C

Cuando se alcanza la temperatura fija, la visualización 22 entonces indica al usuario “Añadir portaobjetos y cerrar tapa”. Antes de añadir portaobjetos, el usuario instala dos tiras de control de humedad en la tapa de portaobjetos interior. Tras la instalación de tiras y tras añadir los portaobjetos, el usuario satura las tiras 18 con agua destilada o equivalente (aproximadamente 13 ml para tiras secas) y cierra la tapa. El cursor resalta la línea “Comenzar” en la visualización 22 (tabla XII). El usuario presiona entonces el botón “Enter” de los medios de entrada y salida 20 para continuar el programa.

Tabla XII

PGM 03 Appl
Añadir Portaobjetos - Cerrar Tapa
Comenzar
Menú Principal

Para volver al Menú Principal, el usuario mueve el cursor para resaltar la línea “Menú Principal” de la visualización 22 y presiona el botón “Enter” de los medios de entrada y salida 20. La visualización 22 entonces indica la temperatura actual de los portaobjetos tal como se muestra en la tabla XIII y el temporizador cuenta el tiempo transcurrido. (La presión del botón “Enter” por el usuario restablecerá el temporizador a cero).

Tabla XIII

PGM 03 Appl
Temp fija: 65°C
Restablecer Temporizador 01:18:10
Finalizar PGM/Menú Principal

5 El usuario puede usar las teclas de flechas de los medios de entrada y salida 20 para mover la visualización resaltada a la línea “Finalizar PGM/Menú Principal” y entonces presionar el botón “Enter” para finalizar el programa. Como indican los ejemplos anteriores (ejemplo A a ejemplo D), los depósitos 18 que son las tiras de control de humedad pueden ser útiles en un hibridizador.

Sin embargo pueden usarse en muchos otros aparatos. La figura 8 y las figuras 12-16 muestran realizaciones adicionales de la invención con un único portaobjetos de tejido 15 sobre una placa de calentamiento 16 cubierta por un depósito 18 según la presente invención.

10 En la realización mostrada en la figura 8, la propia tapa 14 es una hoja de material hidrófilo tal como se definió anteriormente en el presente documento para las tiras 18. Los hilos de calentamiento pueden estar integrados en el material hidrófilo. Además, el material puede tener dos capas. Tal tapa puede disponerse simplemente encima de una placa de calentamiento que porta uno o más portadores de muestra, tales como portaobjetos de microscopio.

15 Tal disposición puede incorporarse en varios tipos de aparato para procesar muestras, tales como aparatos de tinción automáticos, tanto del tipo carrusel como aparatos de tinción con robots que mueven reactivos y/o portaobjetos.

20 También la disposición mostrada en la figura 8 y las figuras 12-16 puede usarse en una versión inclinada. Tal como se indica en las figuras 13-14, el depósito 18 tal como se muestra en la figura 8 puede incorporarse en una tapa 14 similar a la realización mostrada en la figura 1, pero con solamente un depósito y un portaobjetos 15. Una placa de calentamiento 16a puede estar unida o integrada en la tapa 14, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 5A.

25 En la figura 16, se muestra un brazo robótico 30 dispuesto sobre la tapa 14. La tapa 14 está provista de un orificio 24 que proporciona una entrada para el fluido al depósito 18 y permite que el robot proporcione un fluido, tal como agua o un reactivo al depósito y/o a la muestra. Esto es para resaltar que el aparato según la presente invención puede ser parte de un instrumento de procesamiento de muestras automático para procesar una pluralidad de muestras biológicas.

La figura 11 muestra una vista similar a la figura 3, en lo presente con un localizador de portaobjetos que ayuda en la disposición de 12 portaobjetos sobre el elemento inferior del aparato en las figuras 1 y 2.

30 Las disposiciones tal como se muestran en las figuras, y específicamente la provisión de un depósito, en cooperación con los sensores de temperatura no mostrados y en cooperación con unidades de control adecuadas, tales como un ordenador, permiten un control preciso del clima alrededor de tejido sobre un portaobjetos 15. Específicamente, el medio adsorbente hidrófilo del depósito permite mejores resultados de tinción que los conocidos hasta ahora al usar equipos de procesamiento de muestras automáticos.

A continuación se presentan siete ejemplos tomados de una prueba de validación de una realización preferida del instrumento tal como se muestra en la figura 1.

35 En el ejemplo 1, el material de depósito era papel de filtro normal, no el material de microfibras recomendado. En los demás ejemplos, las pruebas se llevaron a cabo usando las tiras de microfibras recomendadas denominadas “tiras de control de humedad de hibridizador”. Estas tiras eran placas apaisadas hechas de combinaciones no tejidas y unidas de microfibras de polipropileno y polietileno modificadas hidrófilas.

Ejemplo 1: Validación FISH

40 Esto es un ejemplo con TOP2A y tiras de papel de filtro. Los criterios de aceptación de promedio de TOP2A: puntuación 1,5-3 (intensidad y especificidad de señal). Se requiere una puntuación de al menos 2 de promedio o una puntuación de desviación dentro de $\pm 0,5$ de promedio de la referencia. Resultados discrepantes individuales pueden excluirse por motivos obvios y si se notifican. La primera ejecución con TOP2A en hibridizador se realizó con tiras de papel de filtro (tiras de filtro), tabla 1A. El instrumento se probó con doce portaobjetos del mismo bloque de tejido y dio como resultado una puntuación promedio de las intensidades de señal de TOP2A que se parecen a las intensidades de señal de los portaobjetos de referencia manual. Las intensidades de señal de TOP2A que se parecen a las intensidades de señal de centrómero 17 en hibridizador, puntuación 2,0, no se parecieron a las intensidades de la referencia manual, puntuación 3. Las intensidades de señal de centrómero con una puntuación inferior a 1,5 se observaron para dos de

los doce portaobjetos. La intensidad de señal de centrómero 17 fue, sin embargo, 2 de promedio, señal roja, HER2 se pareció a las referencias manuales y, por tanto, los criterios de aceptación apenas se cumplieron. La tabla muestra datos brutos de sondas TOP2A en secciones cortadas del mismo bloque de tejido de cáncer de mama fijadas en formalina, integradas en parafina; realizado en un instrumento hibridizador con tiras de papel de filtro como tiras de humedad.

5

Tabla 1

Portaobjetos nº	Posición en hibridizador/ prueba manual	Intensidad de señal roja	Intensidad de señal verde	Estructura de tejido
1	1	2,5	2,5	3
2	2	2,5	2,5	3
3	3	1,5	1	3
4	4	3	2,5	3
5	5	3	2,5	3
6	6	2,5	2	3
7	7	2,5	3	3
8	8	2,5	1,5	2,5
9	9	2	1,5	2,5
10	10	3	2,5	3
11	11	2	1	2,5
12	12	2	2	3
13	Prueba manual	2,5	3	2,5
14	Prueba manual	2	3	2,5
1-12	Media	2,4	2,0	2,9
	Estándar	0,469	0,656	0,226
13-14	Media	2,3	3,0	2,5

2: Ejemplo con TOP2A y tiras de control de humedad de hibridizador DakoCytomation

- 10 Una ejecución realizada en el instrumento hibridizador confirmó que los criterios de aceptación se cumplieron fácilmente si se usaron tiras de control de humedad de hibridizador (0,198 g/cm³) en lugar de tiras de filtro de papel. La ejecución de prueba del instrumento fue tan buena como el procedimiento manual. En conclusión, el hibridizador pasó los criterios de aceptación para TOP2A. Las puntuaciones de los portaobjetos fueron tan buenas como los procedimientos manuales cuando se usaron tiras de control de humedad de hibridizador.
- 15 La tabla (tabla 2) muestra datos brutos de sondas de TOP2A en secciones cortadas del mismo bloque de tejido de cáncer de mama fijadas en formalina, integradas en parafina, realizado en un instrumento hibridizador con tiras de control de humedad de hibridizador (espesor de 3 mm, 0,198 g/cm³). Señal verde, centrómero 17; señal roja, HER2.

Tabla 2

Portaobjetos nº	Posición en hibridizador/ prueba manual	Intensidad de señal roja	Intensidad de señal verde	Estructura de tejido
1	1	3	2,5	3
2	2	3	2,5	3
3	3	3	3	3
4	4	3	3	2,5
5	5	3	2,5	2,5
6	6	3	3	2,5
7	7	3	3	3
8	8	3	3	3
9	9	3	2,5	3
10	10	3	2,5	3
11	11	3	3	2,5
12	12	3	3	3
13	Prueba manual	3	3	3
1,4	Prueba manual	3	3	3
1,5	Prueba manual	3	2,5	3
1-12	Media	3,0	2,8	2,8

ES 2 614 425 T3

	Desviación estándar	0,000	0,246	0,246
13-15	Media	3,000	2,8333	3,000
	Desviación estándar	0,0	0,3	0,0

Ejemplo 3 HER2

Los criterios de aceptación de promedio de HER2: puntuación 1,5-3 (intensidad y especificidad de señal). Se requiere una puntuación de al menos 2 de promedio o una puntuación de desviación dentro de $\pm 0,5$ de promedio de la referencia. Los resultados discrepantes individuales pueden excluirse por motivos obvios y si se notifican. La ejecución con HER2 en hibridizador se realizó con tiras de control de humedad de hibridizador ($0,270 \text{ g/cm}^3$). El instrumento se probó con secciones de tejido de diferente espesor ($2 \mu\text{m}$ a $6 \mu\text{m}$) del mismo bloque de tejido fijado en formalina e integrado en parafina. La ejecución dio como resultado puntuaciones de intensidades de señal y estructuras de tejido que se parecieron a la referencia manual. No se observó ninguna desviación de puntuación de grado $\pm 0,5$ o superior de promedio. En conclusión, el hibridizador pasó los criterios de aceptación para HER2. Las puntuaciones de los portaobjetos eran tan buenas como los procedimientos manuales. La tabla 3 muestra datos brutos de secciones de sonda de HER2 cortadas del mismo bloque de tejido de cáncer de mama fijado en formalina e integrado en parafina; realizado en instrumento de hibridizador con tiras de control de humedad de hibridizador (espesor de 2 mm , $0,270 \text{ g/cm}^3$). Señal verde, centrómero 17; señal roja, HER2.

Tabla 3

Portaobjetos nº	Espesor de tejido	Posición en hibridizador/ prueba manual	Intensidad de señal roja	Intensidad de señal verde	Estructura de tejido
1	2 μm	1	3	3	2,5
2		2	3	2,5	2,5
3		3	3	3	2
4		Prueba manual	3	3	2,5
5		Prueba manual	3	3	2,5
6	4 μm	4	3	2,5	2,5
7		5	2,5	2,5	2,5
8		6	2,5	2,5	2,5
9		Prueba manual	2	2,5	2,5
10		Prueba manual	2,5	3	2,5
11	6 μm	7	3	3	3
12		8	2,5	2	3
13		9	3	3	3
14		Prueba manual	2,5	3	2,5
15		Prueba manual	2,5	3	3
1, 2, 3	2 μm	Media	3,0	2,8	2,3
6, 7, 8	4 μm	Media	2,7	2,5	2,5
11, 12, 13	6 μm	Media	2,8	2,7	3,0
Manual 4,5	2 μm	Media	3,0	3,0	2,5
Manual 9,10	4 μm	Media	2,3	2,8	2,5
Manual 14,15	6 μm	Media	2,5	3,0	2,8

Ejemplo 4 -MLL y ETV6

Los criterios de aceptación de promedio de MLL y ETV6: puntuación 1,5-3 (intensidad y especificidad de señal). Se permite desviación de puntuación de $\pm 0,5$ de promedio de la referencia. Pueden excluirse resultados discrepantes por motivos obvios y si se notifican.

La ejecución en hibridizador se realizó con tiras de control de humedad de hibridizador ($0,270 \text{ g/cm}^3$). El instrumento se probó con especímenes de muestra del mismo lote de extensiones de metafase. La ejecución dio como resultado mejores puntuaciones de las intensidades de señal de MLL y ETV6 que las observadas con las referencias manuales. La estructura de las células se pareció a las referencias manuales. En conclusión, el hibridizador pasó los criterios de aceptación para MLL y ETV6. Las puntuaciones de los portaobjetos fueron mejores que con los procedimientos manuales. Las puntuaciones obtenidas en hibridizador eran, sin embargo, para ambas sondas, más de grado 0,5 superiores en la señal que las referencias manuales. Estas puntuaciones son superiores a las desviaciones descritas en los criterios de aceptación, pero todavía aceptables. La tabla 4 muestra datos brutos de sondas de translocación, MLL y ETV6, en extensiones de metafase, realizado en instrumento de hibridizador con tiras de control de humedad de hibridizador (espesor de 2 mm , $0,270 \text{ g/cm}^3$).

Tabla 4

Portaobjetos n.º	Mezcla de sonda	Posición en hibridizador	Señal en interfases	Señal en metafases	Estructura de inter y metafases	Comentarios	
1	ETV6	4	3	3	2	-	
2		8	3	3	2	-	
3		3	2,5	2,5	2	-	
4		Prueba manual	2	2	2	2	-
5			2	2	2	2	-
6	MLL	5	2,5	3	2	-	
7		6	2,5	3	2	-	
8		1	2,5	2,5	2,5	-	
9		Prueba manual	1	2	2,5	2,5	-
10			2	2	2	2	-

Método	Señal de inter y metafases	Estructura
Hibridizador 1-3	2,83 ± 0,26	2 ± 0
Hibridizador 6-8	2,58 ± 0,20	2,2 ± 0,29
Manual 4-5	2,0 ± 0	2
Manual 9-10	1,75 ± 0,5	2,25

Ejemplo 5

- 5 Este ejemplo se refiere a la validación CISH de VPH en bloques de tejido fijado en formalina e integrada en parafina. Los criterios de aceptación de promedio de VPH en células: 2,5-4 señal; 0 control negativo; 0-1 fondo; divergencia de grado ± 0,25 de tinción manual (para portaobjetos individuales).

10 La ejecución con sondas de VPH en hibridizador se realizó con tiras de control de humedad de hibridizador. Las intensidades de señal se parecieron completamente a las de las referencias manuales. No se observó ninguna desviación de puntuación. Los niveles de fondo parecieron ser inferiores con hibridizador que con el método manual.

En conclusión, las puntuaciones de intensidades de señal de los portaobjetos fueron tan buenas como el procedimiento manual, cuando la hibridación se realizó con las tiras de control de humedad.

Tabla 5

Datos brutos de sonda de VPH en tejido.

Método	Portaobjetos nº	Bloque nº	Señal	Fondo
Hibridizador	1	236	3	0,25
Hibridizador	2	340	3	0,25-0,5
Hibridizador	6	340	3	0,25
Hibridizador	7	236	3	0,5
Hibridizador	11	236	3	0,5
Hibridizador	12	340	3	0,75
Manual	13	236	3	0,25
Manual	14	236	3	1
Manual	15	340	3	0,75
Manual	16	340	3	0,5

15

Método	Señal	Fondo
Hibridador Portaobjetos 1, 2, 6, 7, 11, 12	3 ± 0	0,42-0,46 ± 0,19-0,20
Manual Portaobjetos 13-16	3 ± 0	0,63 ± 0,32

Ejemplo 6

Telómero

- 20 Los criterios de aceptación de promedio de telómero: puntuación 1,5-3 (intensidad y especificidad de señal). Se permite la desviación de puntuación de ±0,5 de promedio de la referencia. Pueden excluirse resultados discrepantes individuales por motivos obvios y si se notifican.

La ejecución en hibridizador se realizó con tiras de control de humedad de hibridizador (0,22-25 g/cm³). El instrumento de validación se probó con especímenes de muestra de dos lotes diferentes de extensiones de metafase. La ejecución dio como resultado puntuaciones de intensidades de señal y estructuras de tejido que se parecieron a la referencia manual para sondas de telómero marcadas con tanto FISH (K 5325) como Cy3 (K 5326). No se observó ninguna desviación de puntuación superior a grado $\pm 0,5$ de promedio. La estructura de las células se pareció a las referencias manuales. En conclusión, el hibridizador pasó los criterios de aceptación para telómero. Las puntuaciones de los portaobjetos fueron tan buenas como los procedimientos manuales.

Tabla 6

Datos brutos de sondas de telómero, en dos extensiones de metafase diferentes.

Portaobjetos n°	Preparación de metafase	Sonda	Posición en hibridizador	Intensidad de señal	Fondo	Intensidad de señal promedio	Fondo de señal promedio
1	080903-MEM	Telómero/ FITC	1	3	0	3 ± 0	0 ± 0
2			2	3	0		
3			3	0			
4			Prueba manual	3	0	3	0
5	221203-MEM		4	3	0,5	2,67 ± 0,29	0,5 ± 0
6			5	2,5	0,5		
7			6	2,5	0,5		
8			Prueba manual	3	0	3	0
9			Prueba manual	3	0		
10			Prueba manual	3	0		
11	080903-MEM	Telómero/ Cy3	7	3	0	3 ± 0	0 ± 0
12			8	3	0		
13			9	3	0		
14			Prueba manual	3	0	3	0
15	221203-MEM		10	3	0	3 ± 0	0 ± 0
16			11	3	0		
17			12	3	0		
18			Prueba manual	3	0	3	0
19			Prueba manual	3	0		
20			Prueba manual	3	0		

Ejemplo 7 - EBER (VEB)

Los criterios de aceptación de promedio de EBER: puntuación 1,5-3 (intensidad y especificidad de señal). Se permite la desviación de puntuación de $\pm 0,5$ de promedio de la referencia. Pueden excluirse resultados discrepantes por motivos obvios y si se notifican. La ejecución en hibridizador se realizó con tiras de control de humedad de hibridizador (0,22-25 g/cm³). La ejecución dio como resultado puntuaciones de intensidades de señal que se parecieron a la referencia manual. No se observó ninguna desviación de puntuación de grado $\pm 0,5$ o superior de promedio. El fondo pareció ser inferior con hibridizador que con el método manual. En conclusión, el hibridizador pasó los criterios de aceptación para EBER. Las puntuaciones de los portaobjetos fueron tan buenas como los procedimientos manuales.

Tabla 7

Datos brutos de sondas de EBER en tejido VEB-positivo.

Portaobjetos n°	Tejido	Posición en hibridizador	Mezcla de sonda	Intensidad de señal	Fondo
1A	23/96	1	EBER Y5200	2	0
1B			Control neg.	0	0
2A		2	EBER Y5200	2,5	0,5
2B			Control neg.	0	0
3A	73/96 A	3	EBER Y5200	2	0,5
3B			Control neg.	0	0
4A		4	EBER Y5200	2	0
4B			Control neg.	0	0
5A	23/96	Prueba manual	EBER Y5200	2,5	0,5
5B			Control neg.	0	0
6A			EBER Y5200	2,5	1
6B			Control neg.	0	0,5
7A			EBER Y5200	2,5	0,1

ES 2 614 425 T3

7B	73/96A		Control neg.	0	0,5
8A			EBER Y5200	2	0
8B			Control neg.	0	0,5

Método	Intensidad de señal	Fondo
Hibridizador EBER 1A-4A	2,13 ± 0,25	0,25 ± 0,28
Hibridizador control neg. 1B-4B	0 ± 0	0 ± 0
Manual EBER 5A-8A	2,38 ± 0,25	0,4 ± 0,45
Manual control neg. 5B-8B	0 ± 0	0,38 ± 0,25

5 Finalmente, las pruebas también se realizaron en una cámara de portaobjetos único tal como se muestra en la figura 15 con un único portaobjetos de tejido en la cámara. Las pruebas demostraron que el depósito según la invención proporciona el mantenimiento de humedad adecuada en la muestra sobre el portaobjetos.

Lista de números de referencia

- 10; aparato, hibridizador
- 12; elemento inferior
- 14; elemento de tapa
- 10 15; elementos portadores, portaobjetos de microscopio
- 16; placa de calentamiento de temperatura controlada
- 16a; placa de calentamiento en la tapa 14
- 18; tiras de control de humedad - depósito
- 20; panel de control- teclado numérico
- 15 22; visualización
- 24; orificio en la tapa
- 28; depósito adicional para rellenar el depósito 18
- 30; brazo robótico

20 Se han dado a conocer un aparato y métodos para procesar muestras biológicas y un depósito para el mismo. Aunque la realización preferida de la presente invención se ha descrito en el contexto de un hibridizador para 12 portaobjetos, se apreciará que las enseñanzas de la presente invención pueden aplicarse a cualquier número de portaobjetos que se procesan en cualquier número de cámaras equipadas con cualquier sistema para controlar la temperatura y humedad, por ejemplo, en equipos de procesamiento de muestras automatizados que comprenden una pluralidad de placas de calentamiento, disponiéndose cada una para portar un único portaobjetos de microscopio con tejido. También, aunque todas las figuras muestran el depósito por encima del portaobjetos sobre la placa de calentamiento en la parte inferior debe entenderse que la cámara puede colocarse al revés de modo que el depósito estaría dispuesto debajo del portaobjetos.

REIVINDICACIONES

1. Aparato para procesar muestras biológicas que comprende medios para procesar al menos una muestra biológica alojada sobre al menos un elemento portador (15) en una cámara, en el que el aparato comprende:
 - 5 Un elemento inferior (12) de la cámara, elemento inferior (12) que está configurado para soportar la al menos una muestra biológica alojada sobre el al menos un elemento portador (15); y

Al menos un depósito (18) que puede adsorber y/o absorber y desorber y/o liberar agua, al menos un depósito (18) que está dispuesto dentro de la cámara; y en el que el aparato se caracteriza por:

Una tapa (14) para la cámara, tapa (14) a la que se une el al menos un depósito (18) y que en una posición cerrada está configurada para cubrir la al menos una muestra de modo que el al menos un depósito (18) no toca la al menos una muestra biológica sobre el al menos un elemento portador (15), y en el que

El elemento inferior (12) incluye una placa de calentamiento de temperatura controlada (16) para controlar la temperatura del elemento portador (15) y de la al menos una muestra biológica sobre el elemento portador (15), dicha placa de calentamiento (16) está dispuesta debajo del al menos un elemento portador (15), en el que el al menos un depósito (18) o bien absorbe o bien desorbe agua y vapor de agua para controlar la humedad relativa dentro de la cámara cerrada a al menos el 80% de humedad relativa, cuando la tapa (14) está posicionada en la posición cerrada, y en el que el depósito (18) es un dispositivo hecho de un material que tiene un área superficial interior alta para absorber y desorber el agua y el vapor de agua.
 2. Aparato según la reivindicación 1, caracterizado porque el depósito (18) se coloca a menos de 5 cm del elemento portador (15), preferiblemente a menos de 1,0 cm del elemento portador (15), todavía más preferiblemente a menos de 0,50 cm del elemento portador (15).
 3. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizado porque un área superficial macroscópica del depósito (18) que es adyacente a y/o orientada a la muestra sobre el elemento portador (15) es de más del 10% del área del elemento portador total, y preferiblemente más del 30% del área del elemento portador total e incluso más preferiblemente más del 60%.
 4. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la placa de calentamiento (16) comprende además al menos un elemento seleccionado del grupo que comprende un sensor de temperatura, hilos de calentamiento, un calentador inductivo, y medios de enfriamiento.
 5. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado por medios adicionales de calentamiento y/o enfriamiento (16a) configurados para calentar el depósito (18), y caracterizado porque la placa de calentamiento (16) para calentar la muestra sobre el elemento portador (15) y los medios adicionales de calentamiento y/o enfriamiento (16a) para calentar el depósito (18) se controlan de manera separada, y pueden calentarse a temperaturas diferentes, de modo que el depósito (18) puede estar más caliente que la muestra o viceversa.
 6. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el depósito (18) está conformado como una hoja sustancialmente plana.
 7. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque el espesor del depósito (18) es menos de 1/10 de la longitud.
 8. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la tapa (14), que en una posición cerrada sobre varios portaobjetos colocados en numerosas placas de temperatura controlada (16).
 9. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el agua incluye aditivos, tal como un agente antimicrobiano.
 10. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el agua se mezcla con formamida, tampones acuosos, alcoholes, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, N-metil-pirrolidona, tampones no acuosos o mezclas complejas que contienen sales inorgánicas, detergentes, tampones de pH, disolventes orgánicos, glicerol, y/o aceite.
 11. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el depósito (18) es un dispositivo hecho de un material que tiene un área superficial interior muy alta que comprende una pluralidad de cavidades que pueden alojar un fluido.
 12. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el depósito (18) es un dispositivo hecho de un material que tiene un área superficial interior muy alta, y en el que al menos una parte sustancial de la(s) superficie(s) es hidrófila.

13. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el depósito (18) está hecho de un material del grupo que comprende materiales compuestos y combinaciones de fibras poliméricas, materiales de fibra de vidrio, polímeros porosos expandidos, cerámicas porosas, rockwool™, pulpa de madera, cartón, piel o materiales basados en celulosas.
- 5 14. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el depósito (18) está hecho de un material que comprende cualquiera de las composiciones del grupo que comprende polietileno, polipropileno, poliuretanos, polisulfonas, polivinilo, composiciones poliacrílicas, etilvinilacetato, rayón viscosa, poliestireno, poliestireno macroreticular, polímeros alifáticos o condensados de fenol-formaldehído, epoxi, algodón, polisacárido, polisacáridos modificados, pulpa de madera, carbonato de calcio, geles de sílice, fibra de vidrio, bentonita, perlita y zeolita.
- 10 15. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el depósito (18) está hecho de un material del grupo que comprende fibras, microfibras, textiles o textiles empenachados tejidos o tricotados, unidos, no unidos poliméricos artificiales o sintéticos.
- 15 16. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el depósito (18) está hecho de un material del grupo que comprende fibras de poliamida, poliéster, poliolefinas y acetato de celulosa unidas.
17. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el depósito (18) está impregnado con un agente antimicrobiano u otros agentes protectores.
- 20 18. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el tipo, forma y tamaño del material del depósito (18) se selecciona para optimizar propiedades superficiales para coincidir con la tensión superficial del líquido
19. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el material del depósito (18) tiene una densidad de desde 0,050 hasta 1,5 gramos/cm³, preferiblemente desde 0,075 hasta 0,75 gramos/cm³.
- 25 20. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el depósito (18) puede contener al menos un volumen mínimo predefinido de líquido por elemento portador (15), eligiéndose el volumen mínimo predefinido del grupo que consiste en 10 microlitros, 100 microlitros, 200 microlitros, 500 microlitros y 1000 microlitros.
- 30 21. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque un depósito adicional (28) está dispuesto encima de la tapa (14) fuera de la cámara, depósito adicional (28) que está en comunicación de fluido con el depósito (18) y para llenar el depósito (18) con líquido durante el procesamiento de muestras.
- 35 22. Método de procesamiento de muestras biológicas, en el que al menos una muestra biológica está dispuesta sobre un elemento portador (15), para el tratamiento para preparar la muestra mediante tinción, el método comprende:
- 40 proporcionar un elemento inferior (12) para soportar el elemento portador (15); unir al menos un depósito (18) que puede absorber y/o adsorber y desorber y/o liberar agua a una tapa (14) y cubrir la al menos una muestra con la tapa (14) de modo que el al menos un depósito (18) no toca la al menos una muestra biológica sobre el elemento portador (15);
- controlar la temperatura del elemento portador y la al menos una muestra biológica con una placa de calentamiento (16) dispuesta debajo del al menos un elemento portador (15); y
- mantener sustancialmente al menos el 80% de humedad relativa dentro de la cámara a través de absorción o desorción de agua y vapor de agua, en el que el depósito (18) es un dispositivo hecho de un material que tiene un área superficial interior alta para absorber y desorber el agua y el vapor de agua.
- 45 23. Método según la reivindicación 22, caracterizado por mantener sustancialmente al menos el 85% de humedad relativa, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% de humedad relativa por encima de la muestra a través de la presencia cercana de un depósito (18) lleno de agua.
24. Método según la reivindicación 22 ó 23, en el que el depósito (18) se suministra con agua tras la disposición de la muestra sobre el elemento portador (15).

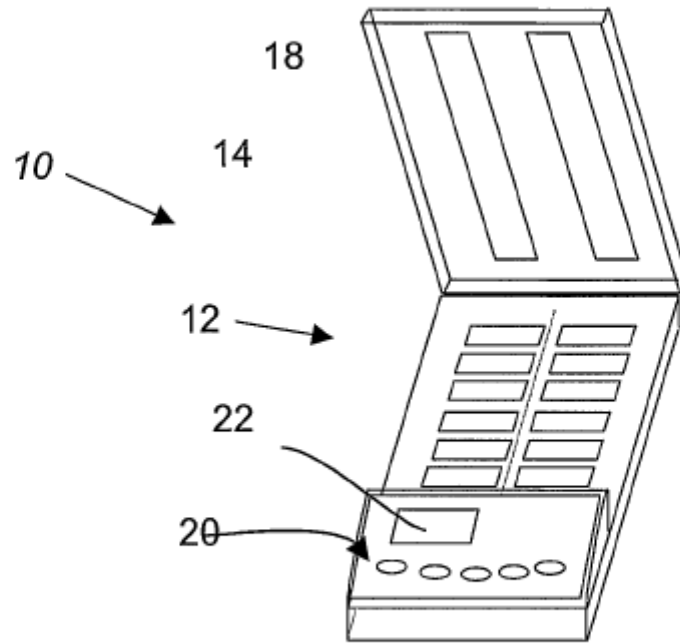


FIG. 1

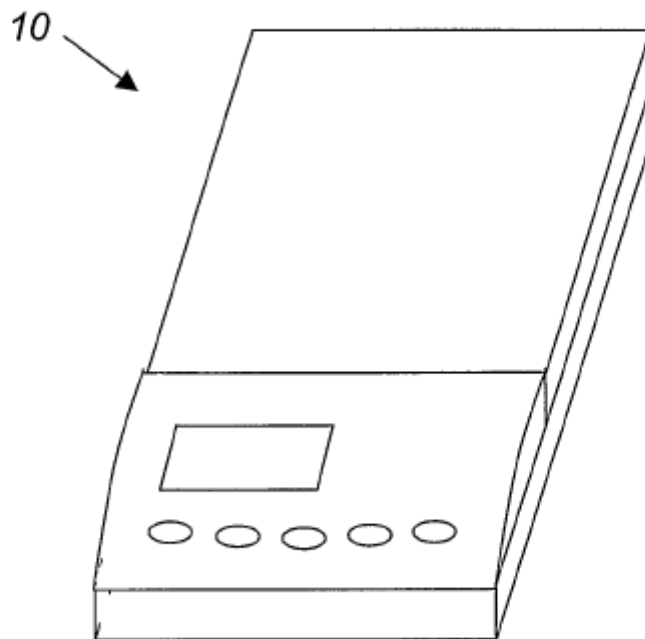


FIG. 2

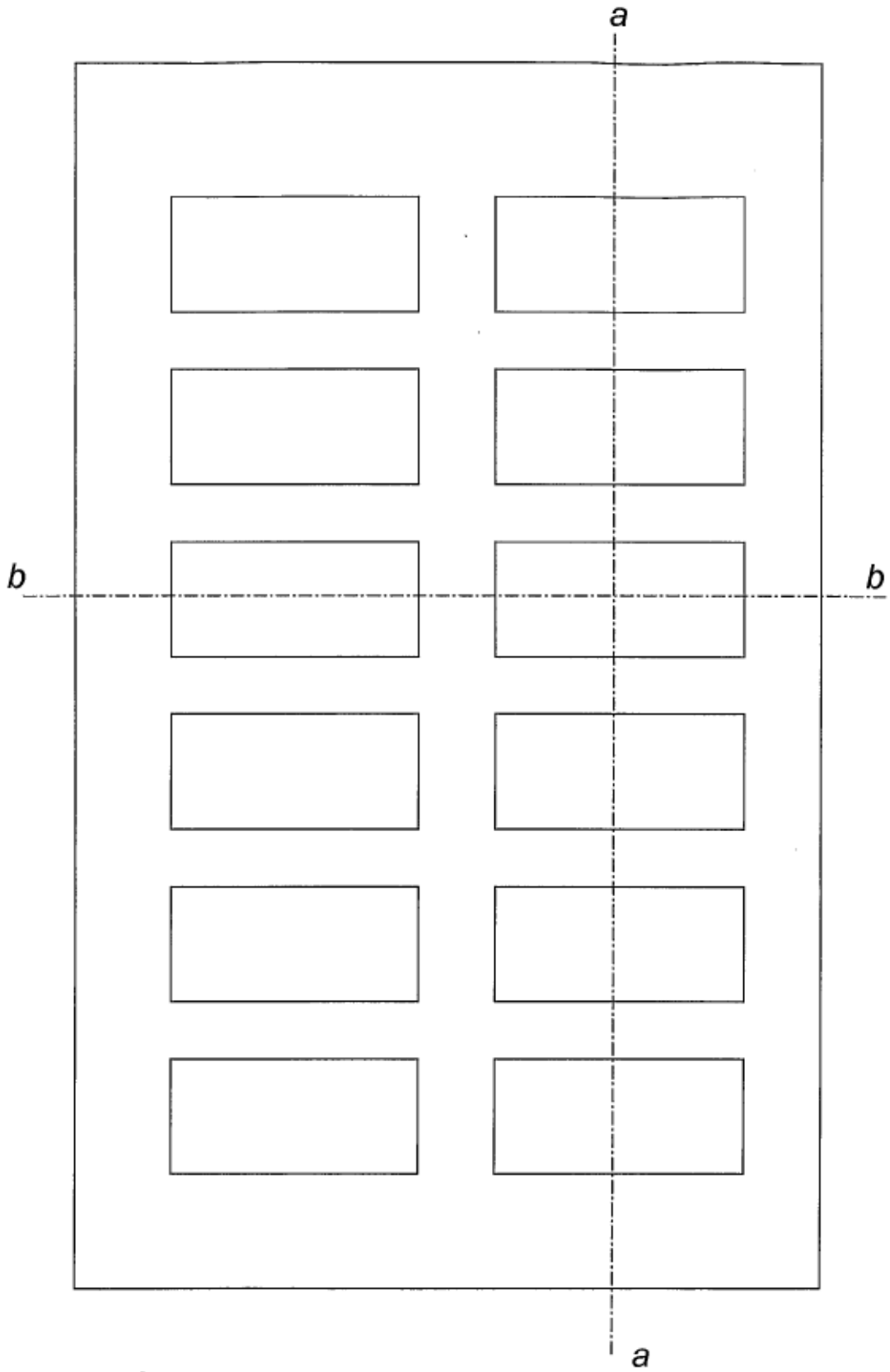
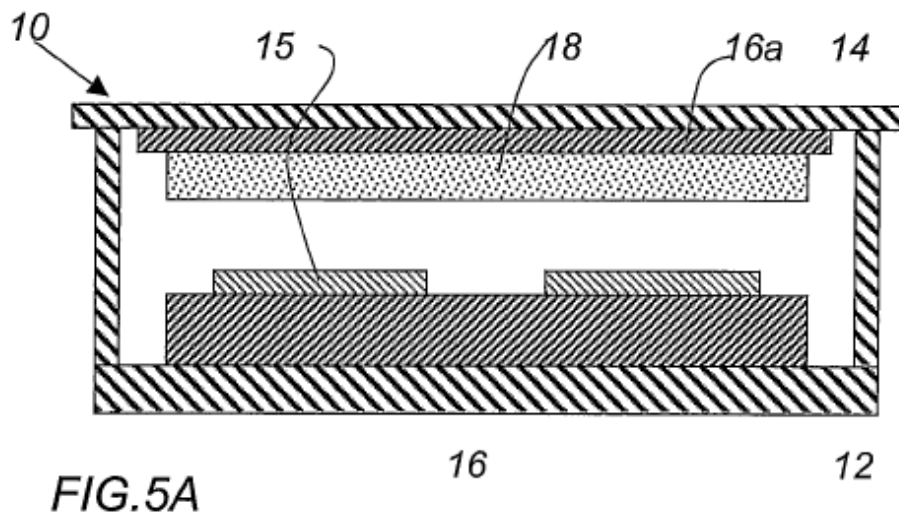
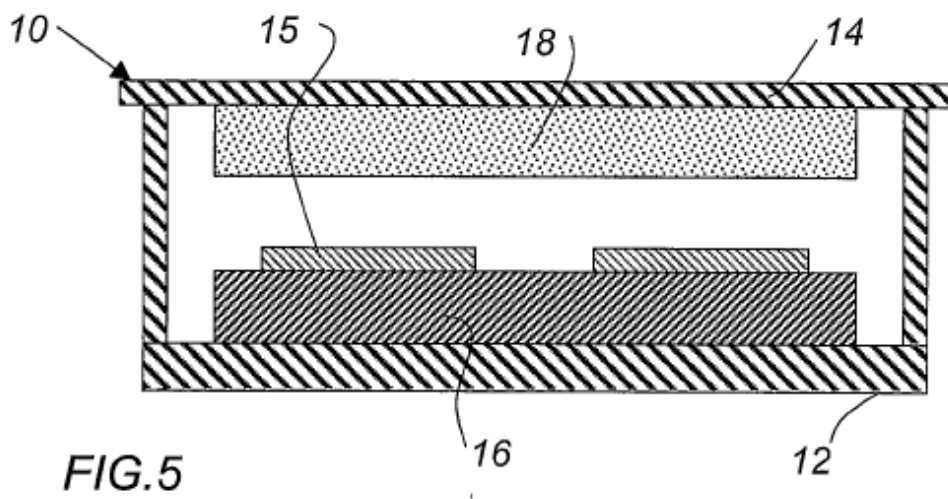
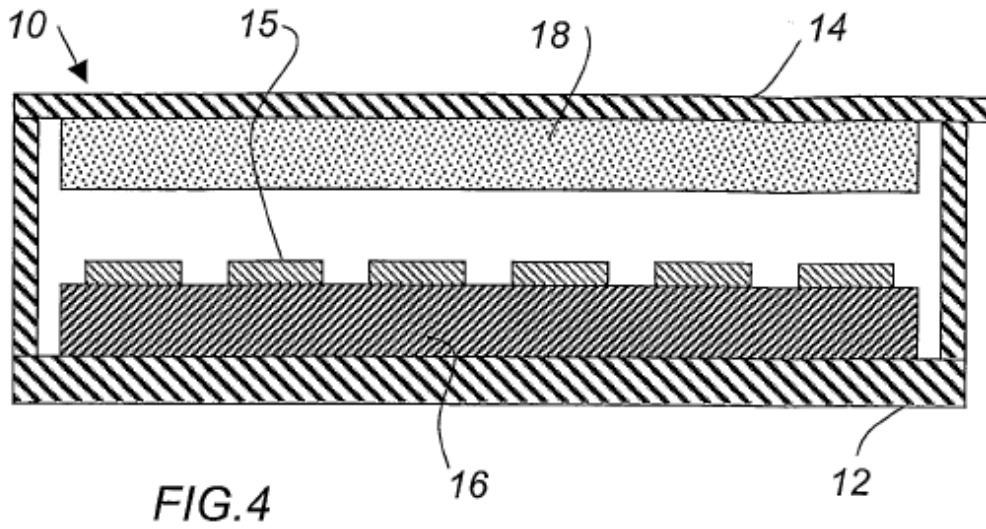


FIG. 3



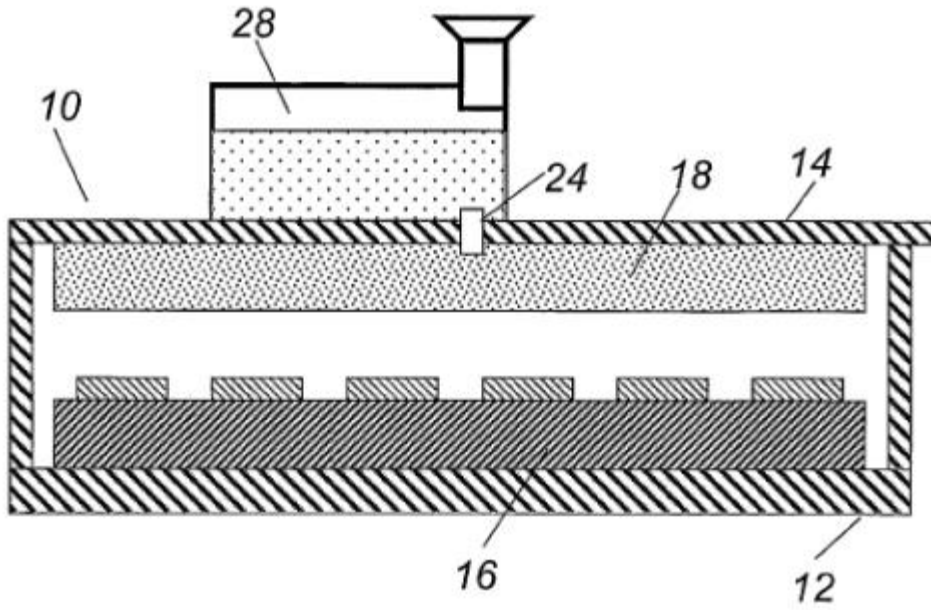


FIG.6

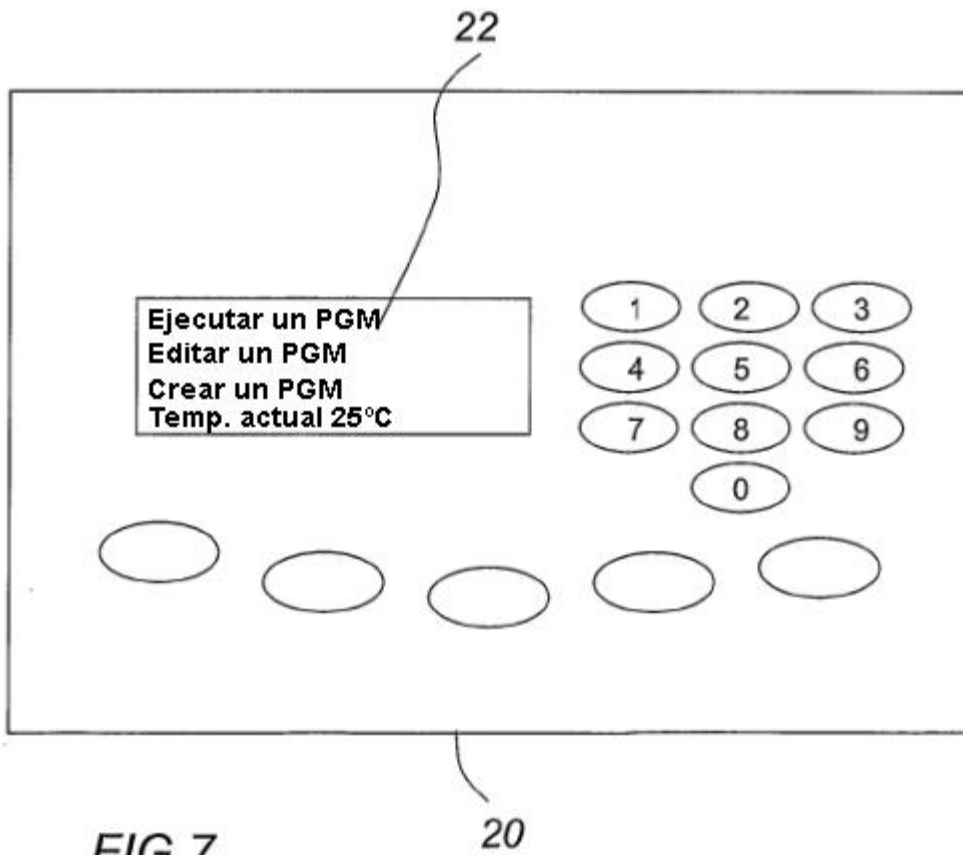


FIG.7

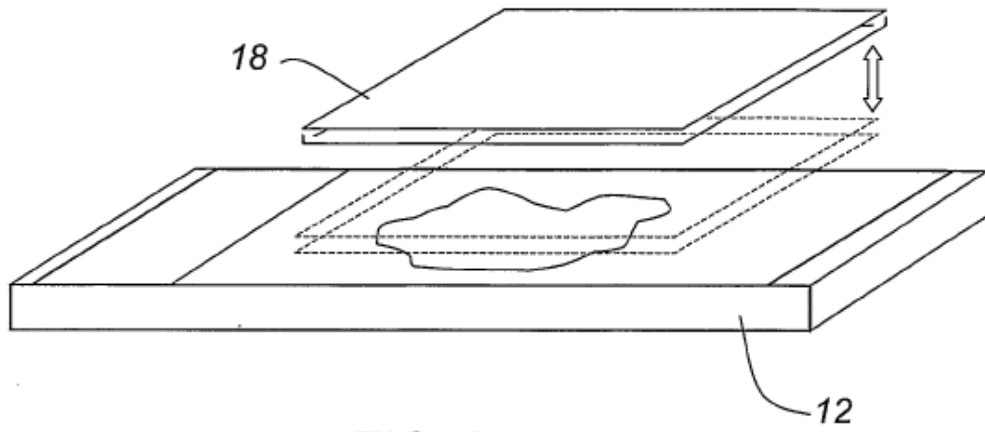


FIG. 8

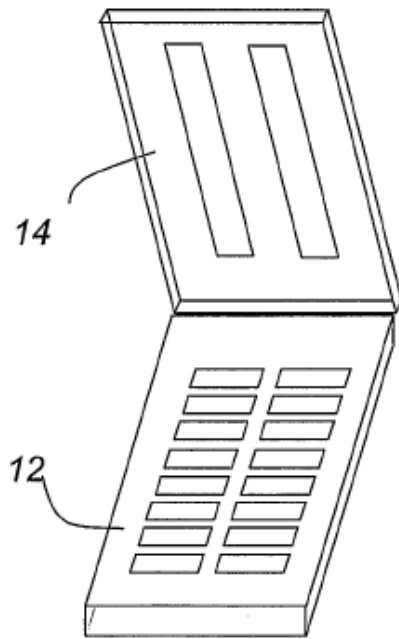


FIG. 9

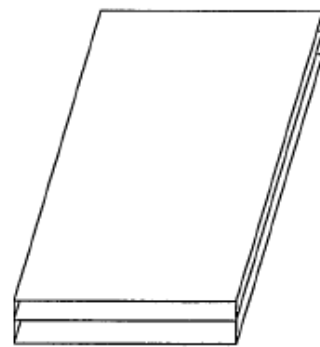


FIG. 10

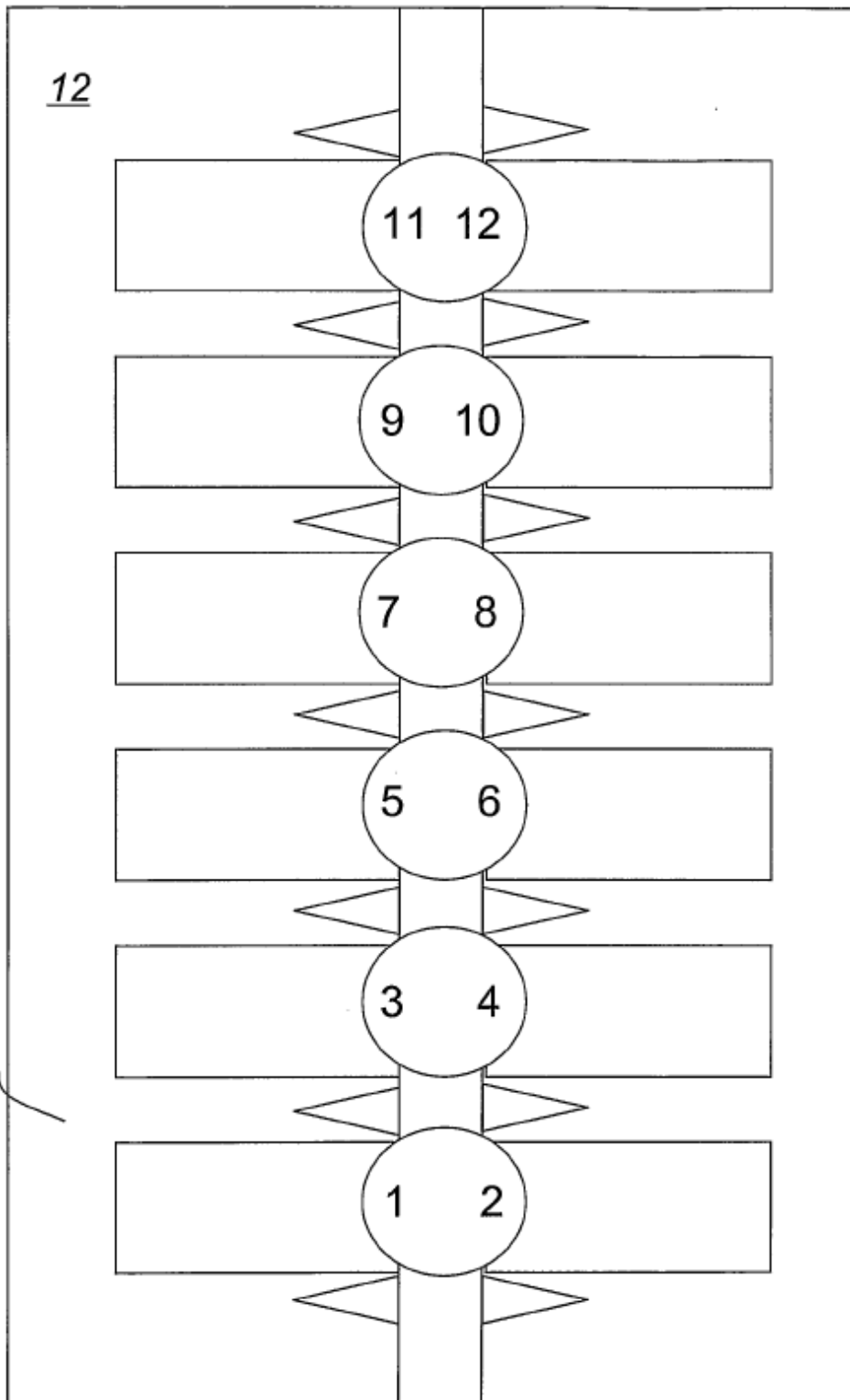


FIG. 11

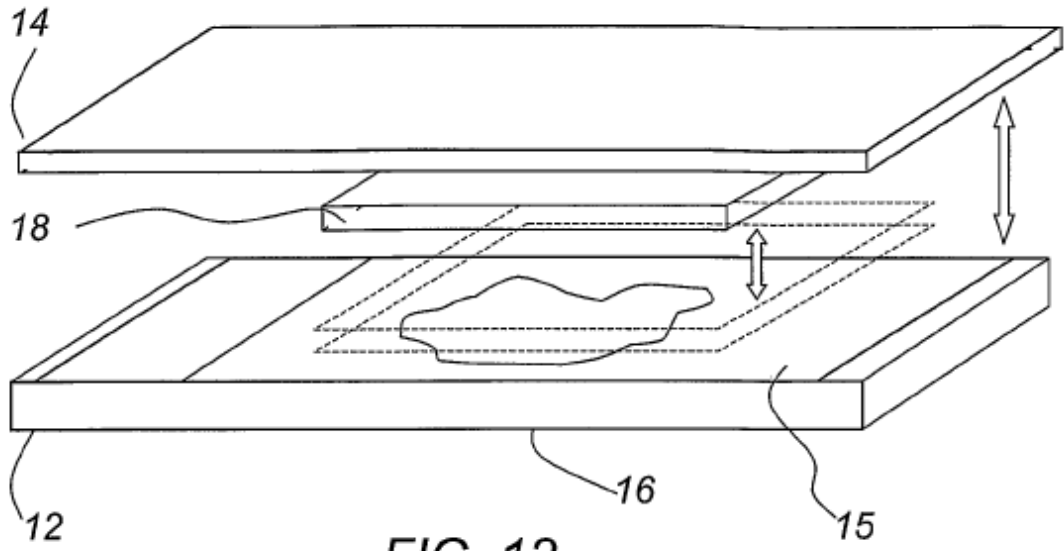


FIG. 12

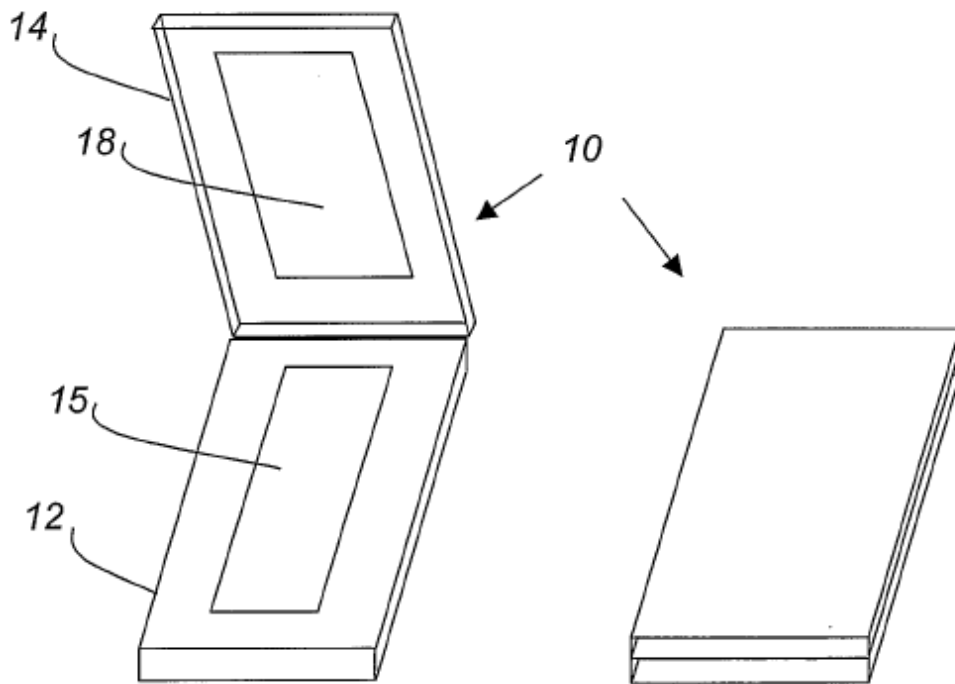


FIG. 13

FIG. 14

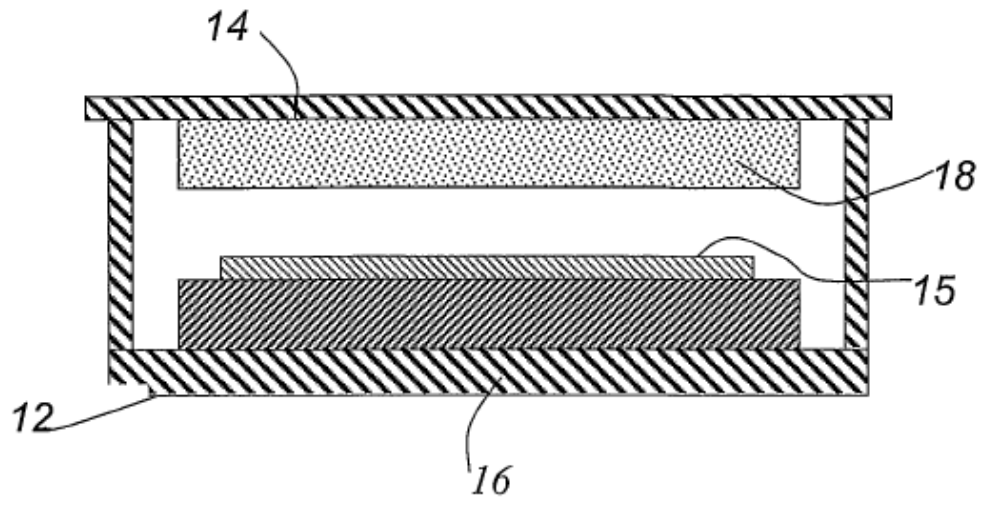


FIG. 15

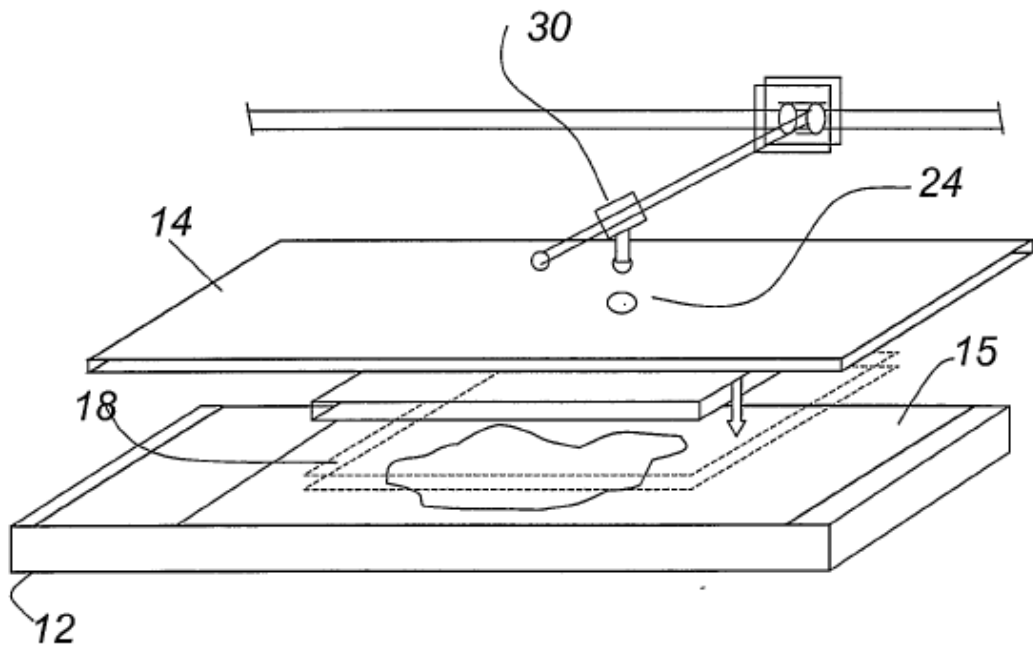


FIG. 16