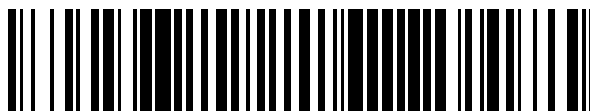


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 297**

51 Int. Cl.:

G01N 1/31 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

G01N 35/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2011 PCT/US2011/060028**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12064873**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2011 E 11785554 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2638381**

54 Título: **Aparato automático para preparar muestras biológicas para examinar**

30 Prioridad:

21.07.2011 US 201161510180 P
10.11.2010 US 460775 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2019

73 Titular/es:

ROCHE DIAGNOSTICS HEMATOLOGY, INC.
(100.0%)
69 Milk Street, Suite 120
Westborough, MA 01581, US

72 Inventor/es:

LAPEN, DANIEL;
ZAHNISER, DAVID;
LICARI, MARK;
MCKEEN, BRIAN J.;
YEATON, ERIC D. y
POOLE, DENNIS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 700 297 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 automático para preparar muestras biológicas para examinar

Antecedentes

5 Durante años, los tecnólogos de laboratorio han utilizado tintes y colorantes tales como los utilizados en la tinción de Romanowsky para preparar muestras biológicas para mejorar el contraste de una muestra durante el examen. Dicho examen normalmente utiliza un microscopio, otro dispositivo que captura imágenes de la muestra o, en otros casos, un examen visual sin ayuda. Se conocen varios sistemas y métodos diferentes para preparar una muestra para el examen. Por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 6.096.271; 7.318.913; y 5.419.279, y las solicitudes de patente publicadas de EE. UU. N.º 2008/0102006 y 2006/0073074 se refieren a máquinas y métodos para teñir un sustrato durante el procesamiento de la muestra. Estas publicaciones proporcionan diversos detalles sobre la tinción y la preparación de muestras para su examen.

10 El documento US 2009/004691 A1 describe un procesador de muestras histoquímicas que comprende un soporte para portaobjetos microscópico, al menos una fuente de sustancia fluidica configurada para permitir la colocación de una sustancia en la proximidad de una muestra; un elemento de confinamiento fluido firme y multidireccional configurado para permitir un ambiente fluido confinado restrictivamente en la proximidad de al menos una parte de dicha muestra en dicho soporte de portaobjetos microscópico; un elemento de fuerza motriz configurado para aplicar una fuerza motriz a dicho elemento de confinamiento fluido firme y multidireccional; un elemento de onda de fluido configurado para actuar en dicho entorno fluido confinado restrictivamente en la proximidad de al menos una parte de dicha muestra; y un procesador histoquímico configurado para lograr automáticamente una secuencia de prueba histoquímica en menos de dicho tiempo de finalización tradicional mientras se siguen logrando dichos resultados deseados.

15 El documento US 2009/117611 A1 describe un dispositivo para humedecer objetos en un portaobjetos, el dispositivo comprende una plataforma dispuesta a una distancia del portaobjetos; y un sistema de ajuste que ajusta angularmente la posición de uno de la plataforma y el portaobjetos con respecto al otro de la plataforma y el portaobjetos entre una primera posición angular y una segunda posición angular de manera que el movimiento desde la primera posición angular a la segunda posición angular distribuye el líquido sobre un área entre dicha plataforma y el portaobjetos.

20 El documento EP 2 499 500 describe una estación de procesamiento de portaobjetos automatizada, que comprende un primer conjunto de platina que tiene una parte curva; un mecanismo de accionamiento configurado para mover el primer conjunto de platina desde una posición de espera a una posición de procesamiento; un conjunto dispensador de líquido para dispensar un líquido; y un segundo conjunto de platina que comprende un dispositivo de posicionamiento de deslizamiento, dicho dispositivo de posicionamiento del portaobjetos que comprende un dispositivo de retención del portaobjetos, el dispositivo de posicionamiento de deslizamiento se puede operar para colocar un portaobjetos retenido mediante el dispositivo de retención del portaobjetos cerca del primer conjunto de platina, estando configurados el primer conjunto de platina y el segundo conjunto de platina para provocar un movimiento de rodadura longitudinal o transversal de la parte curva del primer conjunto de platina con respecto al segundo portaobjetos retenido en el conjunto de platina para crear un hueco de altura variable entre el portaobjetos y la parte curva suficiente para aplicar un líquido a una muestra en el portaobjetos.

Resumen

25 La presente descripción se refiere a un aparato para preparar muestras biológicas sobre un sustrato para examen. Las muestras pueden incluir, por ejemplo, una muestra de sangre que contenga glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, aplicadas a un sustrato, por ejemplo, un portaobjetos de microscopio o un cubreobjetos. Se pueden utilizar diferentes formas de realización para preparar otras muestras biológicas a partir de muestras biológicas que incluyen médula ósea, orina, tejido vaginal, tejido epitelial, tumores, semen, saliva y otros fluidos corporales. Los aspectos adicionales de la descripción incluyen sistemas para fijar, teñir, aclarar y agitar las muestras. En general, los sistemas descritos en la presente memoria proporcionan un procesamiento rápido, eficiente y altamente uniforme de las muestras utilizando cantidades mínimas de fluido. Los sistemas se pueden implementar como un dispositivo independiente o como un componente en un sistema mayor para preparar y examinar muestras biológicas.

30 En general, en un primer aspecto, la descripción presenta un aparato para preparar una muestra biológica sobre un sustrato para examen, siendo definido el aparato adicionalmente en la reivindicación 1 adjunta.

35 Las formas de realización del aparato pueden incluir una o más de las siguientes características individualmente o en combinación.

40 El primer y el segundo actuador pueden ser el mismo actuador configurado tanto para mover el brazo de sustrato como para agitar un sustrato agarrado mediante la pinza de sustrato en el brazo de sustrato. Un área superficial total de la superficie superior de la plataforma puede ser más pequeña que un área superficial total del sustrato. Puede haber al menos tres o más separadores dispuestos en los bordes externos de la superficie superior de la plataforma, donde las puntas de los separadores definen un plano.

5 Se puede situar un orificio de succión en la pinza de sustrato; el orificio de succión se puede conectar a una fuente de succión para proporcionar succión al orificio de succión a través de un tubo de succión, para de este modo sostener el sustrato a la pinza de sustrato. El aparato puede incluir un segundo orificio de tinción situado en la superficie superior de la plataforma en una ubicación diferente de la primera ubicación del orificio de tinción, un segundo depósito de colorante y un segundo conducto de tinción, donde tanto el primer como el segundo orificios de tinción se disponen en el superficie superior a una distancia de un área de muestra en el sustrato cuando el sustrato está en la posición de procesamiento de la muestra, y donde el segundo conducto de tinción se conecta al segundo orificio de tinción para proporcionar una vía de fluido para que el colorante se bombee desde el segundo reservorio de tinción hasta el segundo orificio de tinción y dentro de la separación.

10 El aparato puede incluir un primer orificio de agente de fijación situado en la superficie superior de la plataforma, un depósito de agente de fijación y un conducto de agente de fijación conectado al primer orificio de agente de fijación para proporcionar una vía de fluido para que el agente de fijación se bombé desde el depósito de agente de fijación hasta el primer orificio de agente de fijación y dentro de la separación. El aparato puede incluir un primer orificio de aclarado situado en la superficie superior de la plataforma, un depósito de solución de aclarado y un tubo de aclarado conectado al primer orificio de aclarado para proporcionar una vía de fluido para que el fluido de aclarado se bombé desde el depósito de solución de aclarado hasta el primer orificio de aclarado y dentro de la separación.

15 El aparato puede incluir un primer orificio de vacío situado en la superficie superior de la plataforma, un primer contenedor de desechos y un primer conducto de desechos conectado al primer orificio de vacío para proporcionar una vía de presión negativa para evacuar el fluido de la separación o el sustrato y depositar El fluido en el primer contenedor de desechos. El aparato puede incluir un segundo orificio de vacío situado en la superficie superior de la plataforma y un segundo conducto de desechos conectado al segundo orificio de vacío para proporcionar una vía de presión negativa para evacuar el fluido de la separación o el sustrato y depositar el fluido dentro del primer contenedor de desechos. Los orificios de vacío primero y segundo se pueden situar en extremos opuestos de la superficie superior de la plataforma.

20 La plataforma puede incluir: un orificio de agente de fijación; un segundo orificio de tinción; un orificio de aclarado; un primer orificio de vacío; y un segundo orificio de vacío. El aparato puede incluir un bloque dispuesto para soportar la plataforma, donde el bloque incluye: un orificio de agente de fijación; un segundo orificio de tinción; un orificio de aclarado; un primer orificio de vacío; y un segundo orificio de vacío, donde cada orificio del bloque se encuentra en una ubicación correspondiente a un orificio situado en la plataforma.

25 El aparato puede incluir: un primer depósito de colorante; un segundo depósito de colorante; un depósito de agente de fijación; un depósito de solución de aclarado; un contenedor de desechos; una bomba; varios conductos de fluido conectados a la bomba y a los depósitos y dispuestos para dispensar fluido desde uno o más de los depósitos; y una fuente de vacío para evacuar el fluido desde el sustrato dentro del contenedor de desechos. El aparato puede incluir un secador colocado para dirigir un flujo de aire a través de la muestra cuando el sustrato se sitúa en la posición abierta.

30 Las formas de realización del aparato también pueden incluir cualquiera de las otras características, y cualquier combinación de las características, descritas en la presente memoria, según sea apropiado.

35 En otro aspecto, la descripción presenta sistemas automatizados de examen de muestras que incluyen: una estación aplicadora que aplica una muestra de ejemplo a un sustrato; cualquiera de los aparatos de preparación de muestras biológicas descritos en la presente memoria; y una estación de obtención de imágenes que forma la imagen de la muestra biológica después de la preparación mediante el aparato de preparación de muestras.

40 Las formas de realización del sistema automatizado de examen de muestras pueden incluir una o más de las características descritas en la presente memoria, según sea apropiado, incluyendo una o más de las características del aparato de preparación de muestras biológicas descrito en la presente memoria.

45 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado como lo entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o el ensayo de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación.

50 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista en perspectiva de una forma de realización de un aparato para preparar muestras biológicas para examen, con ambas pinzas de muestras 20A y 20B en una posición abierta.

55 La FIG. 2 es otra vista en perspectiva de una parte del aparato de la FIG. 1 (con los brazos de sustrato y las pinzas de muestra no mostradas).

La FIG. 3A es una vista en perspectiva adicional del aparato de la FIG. 1, con la pinza de muestra 20A en una posición abierta y la pinza de muestra 20B en una posición cerrada (de procesamiento de la muestra).

La FIG. 3B es una vista en perspectiva de un mecanismo de indexación del aparato de la FIG. 1.

5 La FIG. 4 es una vista en perspectiva del aparato de la FIG. 1 que muestra las conexiones entre el aparato y los depósitos de fluido por medio de múltiples conductos de fluido.

La FIG. 5 es una vista en perspectiva de un sistema de examen de muestras que incluye un transportador de sustrato automatizado y una forma de realización de un aparato de preparación de muestras según se describe en la presente memoria.

10 La FIG. 6A es una vista en perspectiva ampliada de una parte del aparato de la FIG. 1 que muestra la pinza de muestra 20B, la plataforma 60B y el bloque 80B en detalle.

La FIG. 6B es una vista en perspectiva de un mecanismo de articulación de rótula del aparato de la FIG. 1.

La FIG. 6C es una vista en sección transversal del mecanismo de articulación de rótula de la FIG. 6B.

La FIG. 7A es un diagrama de flujo que muestra una serie de etapas para mover los brazos de sustrato de una posición abierta a una posición cerrada (de procesamiento de la muestra).

15 La FIG. 7B es un diagrama esquemático de una forma de realización de un aparato de preparación de muestras según se describe en la presente memoria.

La FIG. 8A es un diagrama de flujo que muestra una serie alternativa de etapas para mover los brazos de sustrato desde una posición abierta a una posición de procesamiento de la muestra.

20 La FIG. 8B es un diagrama esquemático de un aparato para preparar muestras biológicas para examen que incluye dos actuadores.

La FIG. 9 es un diagrama de flujo que muestra una serie de etapas para aplicar el agente de fijación a una muestra.

La FIG. 10 es un diagrama de flujo que muestra una serie de etapas para aplicar el colorante a una muestra.

La FIG. 11A es un diagrama de flujo que muestra una serie de etapas para eliminar el exceso de líquido de un sustrato.

25 La FIG. 11B es un diagrama de flujo que muestra una serie alternativa de etapas para eliminar el exceso de líquido de un sustrato.

La FIG. 12 es un diagrama de flujo que muestra una serie de etapas para aclarar una muestra.

La FIG. 13 es un diagrama de flujo que muestra una serie de etapas para agitar una muestra.

La FIG. 14 es un diagrama de flujo que muestra una serie de etapas para secar una muestra.

30 La FIG. 15 es una vista en perspectiva de un aparato de preparación de muestras según se utiliza en un sistema de examen de muestras mayor.

La FIG. 16 es un diagrama de flujo que muestra una serie de etapas para procesar una muestra montada en un sustrato.

35 La FIG. 17 es un gráfico que muestra el volumen de fluido consumido en función del tiempo en el diagrama de flujo de la FIG. 16.

Las FIG. 18A y 18B son vistas en perspectiva del aparato de la FIG. 1 que muestra la colocación de un sustrato sobre un brazo de sustrato por un impulsor de sustrato automatizado.

Símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

Descripción detallada

40 Generalmente se describen en la presente memoria métodos y sistemas para el procesamiento automatizado de muestras biológicas. La invención se refiere a un aparato para el procesamiento automatizado de muestras biológicas según se define en la reivindicación 1 adjunta. Los métodos y sistemas de procesamiento de la muestra automatizados descritos en la presente memoria proporcionan ventajas sobre el método manual y otros métodos de procesamiento automatizados, que incluyen una mayor velocidad de procesamiento al tiempo que se utilizan volúmenes mínimos de reactivos y se produce simultáneamente una preparación de muestras altamente uniforme

que reduce significativamente la variabilidad asociada con la aplicación de colorantes, agentes de fijación y otros reactivos en comparación con muestras procesadas a mano o por otros sistemas.

Los métodos de procesamiento automatizados convencionales normalmente tienen un rendimiento de procesamiento relativamente alto mientras que al mismo tiempo consumen grandes volúmenes de fluidos de procesamiento, o tienen un rendimiento de procesamiento relativamente bajo mientras consumen volúmenes reducidos de fluidos. Para muchas aplicaciones, sin embargo, tanto el funcionamiento de alto rendimiento como el bajo consumo de fluido son deseables. Al mantener un alto rendimiento, las muestras se pueden procesar de manera eficiente para su posterior examen. Al mantener bajo el consumo de fluido, la cantidad de desechos de procesamiento se reduce junto con el volumen requerido de reactivos de procesamiento, lo que mantiene los costes operativos bajos. Los sistemas y métodos descritos en la presente memoria permiten el procesamiento automatizado rápido de muestras (por ejemplo, más de 100 muestras por hora por una sola máquina) utilizando volúmenes bajos de procesamiento (por ejemplo, menos de 1 ml de fluidos por muestra), al tiempo que producen una alta uniformidad y resultados repetibles.

Sistemas y métodos de preparación de muestras biológicas

Antes de examinar las muestras, se preparan en una serie de etapas para mejorar la apariencia visual de determinadas características en las muestras. La FIG. 1 ilustra una forma de realización de un aparato o máquina 1 para preparar una muestra biológica para su examen u obtención de imágenes en un sustrato 2 tal como un portaobjetos de microscopio, un cubreobjetos u otra superficie transparente. La máquina 1 se puede incorporar en un sistema general para preparar y analizar muestras que comprenden fluidos corporales u otras muestras biológicas que contienen células, tal como el sistema 2000 mostrado en la FIG. 15 y se describen a continuación. La máquina 1 generalmente puede incluir, o formar una parte de, un sistema que presenta una primera estación que obtiene una muestra, una segunda estación que aplica la muestra a un sustrato, estaciones tercera y cuarta para fijar y teñir la muestra, respectivamente, una quinta parte estación que seca la muestra, una sexta estación que obtiene una imagen de la muestra y una séptima estación para analizar las imágenes y datos obtenidos de la muestra. Determinadas formas de realización de la máquina 1 son compatibles con el sistema 2000; algunas formas de realización de la máquina 1 se pueden utilizar en otros sistemas de preparación de muestras y/o como dispositivos independientes.

La máquina 1 puede incluir o conectarse a un sistema de control 5 según se muestra en la FIG. 4, que proporciona otra vista en perspectiva de la máquina 1. El sistema de control 5 puede incluir uno o más ordenadores, cada uno con una unidad central de procesamiento capaz de ejecutar instrucciones de software almacenadas en medios legibles por ordenador, como un disco duro, unidad óptica o memoria. Además, el sistema de control 5 puede incluir circuitería eléctrica para ejecutar las instrucciones del software. El sistema de control 5 puede incluir una interfaz de usuario para recibir comandos del usuario para controlar el funcionamiento de la máquina 1. El software almacenado o proporcionado en el ordenador puede incluir programas que controlan el funcionamiento de los componentes de la máquina 1 durante el procesamiento de la muestra, tales como bombas y aspiradoras de fluidos. Por ejemplo, el software puede incluir instrucciones para dirigir la máquina 1 para aplicar varios agentes de fijación, colorantes y aclarados a la muestra, y para realizar varias etapas de agitación durante el procesamiento de la muestra.

Además, el software puede incluir configuraciones predeterminadas y la interfaz de usuario puede contener funciones de personalización para proporcionar al usuario la capacidad para cambiar estas configuraciones predeterminadas. Por ejemplo, la interfaz de usuario puede contener características de personalización para permitir que un usuario personalice la velocidad, la frecuencia o el orden de las fases de fijación, tinción y aclarado, así como los parámetros de agitación (descritos adicionalmente más adelante). El sistema de control 5 también se puede comunicar a través de un protocolo de red (como Appletalk®, IPX o TCP/IP). Por ejemplo, el protocolo de red puede utilizar cables (tales como cables de par trenzado) y/o una conexión inalámbrica como WiFi. El sistema de control se puede conectar a un sistema de información de laboratorio utilizando el protocolo de red. El sistema de información de laboratorio puede contener un servidor y/o una base de datos para almacenar información relacionada con las muestras procesadas en la máquina 1. Por ejemplo, la base de datos puede contener una tabla que proporcione información sobre la persona o la fuente de la muestra (por ejemplo, nombre, fecha de nacimiento (DOB), dirección, hora en que se tomó la muestra, sexo, etc.), información relacionada con el procesamiento de la muestra (procesada en la fecha ####/####/####, número de muestra #, etc.), una copia de cualquier imagen adquirida de la muestra, y copias de cualesquiera resultados obtenidos al analizar las imágenes.

Con referencia a la FIG. 1, la máquina 1 puede incluir soportes 110A y 110B para asegurar el dispositivo a una ubicación dentro de un sistema o una estación de trabajo de laboratorio. La máquina 1 también incluye uno o más brazos de sustrato 10A y 10B, cada uno conectado en su base a un actuador 30A y 30B. Los extremos opuestos de los brazos de sustrato 10A y 10B incluyen pinzas de sustrato 20A y 20B para recibir y sostener los sustratos durante el procesamiento de la muestra. Cada pinza de sustrato 20A y 20B recibe y sostiene un sustrato 2 mientras la máquina 1 completa todas las etapas de procesamiento de la muestra (descritas a continuación). El sustrato puede ser o incluir un portaobjetos de microscopio, un cubreobjetos u otro material transparente adecuado para contener una muestra durante el procesamiento de la muestra y un examen microscópico después del procesamiento de la muestra. La forma de realización de la FIG. 1 representa un portaobjetos de microscopio de vidrio, sustrato 2, que incluye una muestra biológica 3. Utilizando orificios de succión, las pinzas de sustrato 20A, 20B pueden sostener el

sustrato 2 a los brazos de sustrato 10A, 10B durante el procesamiento de la muestra. Un tubo de succión 23 proporciona succión a las pinzas de sustrato 20A y 20B a través de los orificios de succión 21A y 21B, y 22A y 22B (téngase en cuenta que los orificios 21A y 22A se colocan detrás del portaobjetos 2 en la FIG. 1, y se muestran en líneas discontinuas).

5 La forma de realización de la máquina 1 mostrada en las FIG. 1-3 es una máquina de doble sustrato, capaz de sostener y procesar un sustrato en cada uno de los brazos de sustrato 10A y 10B. Otras formas de realización proporcionan el procesamiento de un solo sustrato o tres o más sustratos, secuencial o de forma simultánea. Además, mientras que las formas de realización representadas en las FIG. 1-6 utilizan succión para unir los sustratos 2 a los brazos de sustrato 10A y 10B, las formas de realización alternativas pueden utilizar diversos tipos de pinzas, dedos o imanes (si el sustrato está imantado) para unir un sustrato 2 a un brazo de sustrato 10A durante el procesamiento de la muestra.

15 En las formas de realización mostradas en las FIG. 5 y 18A-B, la máquina 1 recibe un sustrato 2 que porta una muestra 3 de un impulsor de sustrato automatizado 120 o manualmente de una persona. Como ejemplo, el impulsor de sustrato 120 puede ser un dispositivo que transporta un sustrato entre estaciones (por ejemplo, de la estación 121 a la estación 122 a la estación 123, a la estación 124, y a la estación 125). La FIG. 5 muestra un sistema que tiene una primera estación de lector de etiquetas 121, una estación de aplicador 122, una estación de tinción 123 que incluye la máquina 1, una cámara o estación de formación de imágenes 124, y una segunda estación de lector de etiquetas 125. La primera estación de lector de etiquetas 121 se configura para leer la información del sustrato 2, tal como un código de barras y/o información de "huella digital" que se utiliza para identificar el sustrato particular 2 y la muestra 3 en el mismo. La segunda estación de lector de etiquetas 125 funciona de la misma manera, y la información que lee se utiliza para verificar que la muestra 3 de la que se obtiene una imagen en la estación 124 sea la misma que el sustrato que se procesó.

25 El impulsor de sustrato 120 puede incluir una pinza 127 para sostener el sustrato 2, y circuitería de registro o software para permitir al impulsor 120 determinar si el sustrato 2 se monta en el impulsor 120. En una forma de realización, el impulsor de sustrato 120 puede incluir un cilindro hidráulico para mover el sustrato 2 de una primera estación 121 a una segunda estación 122. Después del procesamiento de la muestra, el impulsor de sustrato 120 puede retirar el sustrato procesado de la estación de tinción 123 y transportar el sustrato 2 a otra estación para el examen del sustrato, tal como un microscopio o una estación 124 Alternativamente, una persona puede retirar manualmente un sustrato de la máquina 1 después del procesamiento de la muestra.

30 Los brazos de sustrato 10A y 10B pueden girar alrededor de un eje para permitir que el sustrato se mueva desde una posición abierta para cargar, a una posición de procesamiento de la muestra, y de vuelta a la posición abierta para descargar después del procesamiento de la muestra. La FIG. 7A muestra un diagrama de flujo 500 que incluye una serie de etapas para mover los brazos de sustrato desde una posición abierta a una posición de procesamiento. El diagrama de flujo 500 se describe con más detalle a continuación con referencia a la FIG. 7B, que muestra un diagrama esquemático de la máquina 1.

35 Téngase en cuenta que la máquina 1 en la FIG. 1 se configura para aceptar y examinar dos sustratos. En la siguiente descripción y figuras, se puede hacer referencia a solo un conjunto de componentes en la máquina 1 (por ejemplo, pinza de sustrato 20A, actuador 30A, brazo de sustrato 10A, etc.). Sin embargo, se debe entender que las mismas etapas, características y atributos que se describen en relación con un conjunto de componentes también se pueden aplicar al otro conjunto de componentes en la máquina 1 (por ejemplo, la pinza de sustrato 20B, el actuador 30B, el brazo de sustrato 10B, etc.). Por lo tanto, si bien la descripción en la presente memoria se centra solo en un conjunto de componentes para mayor claridad y brevedad, se entiende que las máquinas para el examen de muestras, tales como la máquina 1, pueden incluir dos o más de dos conjuntos de componentes, cada uno de los cuales tiene algunas o todas las características descritas en la presente memoria.

45 Volviendo a las FIG. 7A y 7B, en una primera etapa 502 del diagrama de flujo 500, el impulsor de sustrato 120 coloca un sustrato 2 en contacto con una pinza de sustrato 20A. En la etapa 504, el sustrato 2 se coloca en la pinza de sustrato en una posición "muestra hacia arriba" o "abierta". A continuación, en la etapa 506, el actuador 30A gira el brazo de sustrato 10A aproximadamente 180° (véase la FIG. 7B) para colocar el sustrato 2 en una posición "muestra hacia abajo" o "de procesado de muestras" o "cerrada" (etapa 508), directamente sobre la plataforma 60A, de manera que el sustrato 2 esté en una posición de procesamiento en la etapa 510.

50 A continuación, en la etapa 512, la máquina 1 tiñe la muestra 3 colocada sobre el sustrato 2 dirigiendo los fluidos adecuados que incluyen los colorantes, los fluidos de lavado y los agentes de fijación que se bombearán desde los depósitos 210A, 211A, 212A y 213A para entrar en contacto con la muestra 3 a través de los orificios 42A, 43A, 44A, y 45A. El exceso de fluidos se retira de la muestra 3 por medio de bombeo de vacío a través de los orificios 40A y 41A, y se recopila en los colectores de desechos 230 y 231.

55 En la etapa 514, después de la tinción de la muestra 3, el actuador 30A gira el brazo de sustrato 10 aproximadamente 180° (invirtiendo la rotación de la etapa 506) para devolver el sustrato a la posición "muestra hacia arriba". Finalmente, en la etapa 516, el impulsor de sustrato 120 retira el sustrato procesado de la pinza de sustrato 20A. También se pueden utilizar otras posiciones abiertas o "muestra hacia arriba", siempre que un operador o un

- impulsor de sustrato automático puedan cargar y descargar los sustratos de la máquina 1. Por ejemplo, la posición de muestra hacia arriba se puede girar 100° o más (por ejemplo, 120° o más, 130° o más, 140° o más) desde la posición de procesamiento de la muestra. En algunas formas de realización, la posición muestra hacia arriba se puede girar menos de 100° (por ejemplo, menos de 90°, menos de 80°, menos de 70°) desde la posición de procesamiento de la muestra, siempre que un operador o un impulsor de sustrato pueda cargar y descargar los sustratos de la máquina 1.
- Los actuadores 30A y/o 30B pueden incluir un motor eléctrico, sistemas neumáticos, sistemas magnéticos u otro hardware (por ejemplo, un tornillo sin fin) para mover el brazo 10A y/o 10B. Cuando los brazos de sustrato 10A y 10B están en una posición abierta según se representa en la FIG. 1, las pinzas 20A y 20B pueden recibir cada una un sustrato 2. Una vez cargadas sobre una pinza de sustrato 20A o 20B, los actuadores 30A y/o 30B giran a continuación los brazos 10A y/o 10B, y por lo tanto el sustrato 2, desde la posición abierta ("muestra hacia arriba") hasta una posición de procesamiento ("muestra hacia abajo", según se muestra para el brazo 10B en la FIG. 3A) para la aplicación de soluciones de agente de fijación, colorante y aclarado, incluidas las etapas de agitación, y regresa a una posición abierta para descargar después del procesamiento.
- Con referencia a la FIG. 3A, el actuador 30B ha girado el brazo de sustrato 10B desde la posición abierta representada en la FIG. 1 a una posición "cerrada" o de procesamiento. La FIG. 3A muestra que el sustrato 2 en el brazo de sustrato 10B se ha volteado y girado aproximadamente 180° desde su posición de carga mostrada en la FIG. 1 a una posición orientada hacia abajo, donde la muestra 3 en el sustrato 2 es, en esencia, paralela a la superficie de la plataforma 60B. Como se describió en relación con la FIG. 7A anteriormente, mientras que el sustrato 2 se coloca proximal a la plataforma 60B en la posición de procesamiento de la muestra mostrada, la máquina 1 aplica diversos agentes de fijación, colorantes y aclarados a la muestra 3 en el sustrato 2 a través de varias fases de procesamiento, que se describirán con mayor detalle a continuación. Para retirar el sustrato 2 de la posición de procesamiento, el actuador 30B gira el brazo de sustrato 10B de nuevo a la posición abierta mostrada en la FIG. 1 (ambos brazos) y la FIG. 3A (donde solo el brazo 10A está en la posición abierta).
- En determinadas formas de realización, el sistema de control 5 puede detectar la posición de los brazos utilizando uno o más sensores 105A y 105B para detectar los brazos indicadores 101A y 101B (según se muestra en las FIG. 1 y 3). Los sensores 105A y 105B pueden ser sensores de proximidad, por ejemplo, sensores fotoeléctricos, que utilizan, por ejemplo, luz infrarroja u otras diversas tecnologías (láseres, detectores de movimiento, etc.) para detectar la presencia o ausencia de los brazos. Por ejemplo, los sensores de proximidad 105A o 105B pueden tener un campo de detección, y los sensores pueden determinar si o no un brazo de sustrato (por ejemplo, brazo 10A y/o 10B) o una pinza de sustrato (por ejemplo, pinza 20A y/o 20B) está dentro del campo de detección. El sistema de control 5 puede recibir información de los sensores para determinar las posiciones de los brazos de sustrato 10. Por ejemplo, cuando el brazo de sustrato 10B (no mostrado en la FIG. 3A) se gira a una posición de procesamiento, el sensor de proximidad 105B en el extremo proximal del brazo indicador 101B detecta la pinza de sustrato objetivo 20B y notifica al sistema de control 5 que el brazo de sustrato 10B ha girado a una posición de procesamiento de la muestra. En esta posición, el sensor de proximidad 105B en el extremo distal del brazo indicador 101B no enviará ninguna señal al sistema de control 5, porque el sensor no detecta ningún objetivo (por ejemplo, un brazo de sustrato o una pinza de sustrato).
- Cuando el brazo de sustrato 10B gira a una posición abierta (según se muestra en la FIG. 1), el sensor de proximidad 105B en el extremo distal del brazo indicador 101B detecta la pinza de sustrato objetivo 20B, y notifica al sistema de control 5 que el brazo de sustrato 10B ha girado a una posición abierta. Dicho de otra manera, cuando el brazo de sustrato 10B ha girado alejándose del sensor 105B, los sensores envían una señal "no presente" al sistema de control 5. Cuando el brazo 10B se gira a la posición abierta, el brazo 10B está más cerca del sensor 105B, y el sensor puede enviar una señal "presente" al sistema de control 5. En configuraciones alternativas, el sensor se puede montar en el sustrato 10B y puede detectar la presencia del brazo indicador 101B. En algunas formas de realización, el sistema de control 5 se puede utilizar para calibrar la posición de los actuadores 30A y 30B en las posiciones abiertas y de procesamiento de la muestra conocidas, y/o para supervisar activamente el movimiento y la posición de los brazos de sustrato 10A y 10B en función de las señales de control y/o la retroalimentación recibida de los actuadores 30A y 30B.
- La estructura y el eje de rotación para los brazos de sustrato 10A y 10B en la FIG. 1 puede variar en otras formas de realización de la invención. La FIG. 8A muestra un diagrama de flujo 600 que incluye una serie alternativa de etapas para mover los brazos de sustrato desde una posición abierta a una posición de procesamiento. El diagrama de flujo 600 se describe con más detalle a continuación con referencia a la FIG. 8B, que muestra un diagrama esquemático de la máquina 1.
- En la etapa 602 del diagrama de flujo 600, el impulsor de sustrato 120 coloca el sustrato 2 en la pinza de sustrato 20A con una orientación "muestra hacia arriba". A continuación, en la etapa 604, un primer actuador 30A hace girar el sustrato 2 aproximadamente 180° en un plano perpendicular al plano de la FIG. 8B, de manera que el sustrato 2 permanezca orientado en una posición "muestra hacia arriba" por encima de la plataforma 60A. En la etapa 606, un segundo actuador 35A recibe el sustrato 2 orientado en la posición "muestra hacia arriba". A continuación, en la etapa 608, el segundo actuador 35A (por ejemplo, colocado entre el brazo de sustrato 10A y la pinza de sustrato 20A) hace girar el sustrato 2 a una orientación de "muestra hacia abajo". El segundo actuador 35A también puede

mover el sustrato 2 hacia abajo hacia la plataforma 60A, de manera que el sustrato 2 haga contacto con los separadores 70A y 70B.

A continuación, con el sustrato 2 en la posición de procesamiento en la etapa 610, la máquina 1 tiñe la muestra 3 en el sustrato 2 aplicando colorantes, agentes de fijación y soluciones de lavado según se describió anteriormente en relación con la etapa 512 del diagrama de flujo 500. Después de completar la tinción, el segundo actuador 35A hace girar al sustrato 2 desde una orientación "muestra hacia abajo" a una orientación "muestra hacia arriba" (etapa 614), y a continuación el primer actuador 30A hace girar el sustrato 2 aproximadamente 180° (por ejemplo, en un plano perpendicular al plano de la FIG. 8B, invirtiendo la rotación aplicada en la etapa 606) de manera que el sustrato permanezca orientado en una posición de "muestra hacia arriba". Finalmente, en la etapa 618, el impulsor de sustrato 120 retira el sustrato procesado de la pinza de sustrato 20A.

En general, la máquina 1 puede incluir una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco) plataformas 60A y 60B según se muestra en las FIG. 1-3 para el procesamiento de la muestra. Según se muestra en la FIG. 2, la plataforma 60A puede incluir lados laterales para soportar un lado superior de la plataforma. Un escudo 100, mostrado en las FIG. 1 y 3, se puede colocar entre las plataformas 60A y 60B para evitar que los fluidos salpiquen entre las plataformas 60. En algunas formas de realización, el escudo 100 se puede formar a partir de un material transparente que bloquee los fluidos de una de las plataformas 60A y 60B para que no contaminen a la otra plataforma. En determinadas formas de realización, el escudo 100 se puede formar a partir de un material que sea translúcido u opaco. En las FIG. 1 y 3, el escudo 100 se representa como estando formado a partir de un material transparente para permitir que otros componentes colocados detrás del escudo 100 se muestren en la misma figura. El escudo 100 también se podría haber mostrado como formado a partir de un material opaco, en cuyo caso se habrían ocultado partes de algunos componentes, tales como la plataforma 60A y el bloque 80A.

La FIG. 3B muestra un mecanismo de indexación 50A que se puede utilizar para trasladar la máquina 1 para proporcionar sustratos 2 desde cada una de las pinzas de sustrato 20A, 20B a una posición para el procesamiento de la muestra. El mecanismo de indexación 50A puede ser de muchas formas, tales como dispositivos electromecánicos (por ejemplo, un conjunto de piñón y cremallera accionado por un motor eléctrico), actuadores lineales (por ejemplo, actuadores neumáticos, actuadores hidráulicos o actuadores electromagnéticos). Aunque, en la forma de realización ilustrada, el mecanismo de indexación 50A traslada la máquina 1 linealmente entre dos posiciones, son posibles otras rutas de traslado en función del número de plataformas incluidas en la máquina 1, y su configuración y diseño, tal como circular o semicircular. (por ejemplo, una tabla de indexación que se pueda mover en una trayectoria arqueada). Según se muestra, el mecanismo de indexación 50A puede incluir engranaje de cremallera 50B unido a una base 50C de la máquina 1 y un engranaje de piñón 50D unido a un motor eléctrico 50E que está fijo a la base 50C. La máquina 1 se puede unir a la base 50C utilizando uno o más dispositivos de deslizamiento 50F de manera que la máquina 1 se pueda mover sin problemas cuando es trasladada por el mecanismo de indexación 50A. Durante la utilización, el mecanismo de indexación 50A puede mover la máquina 1 de manera que las múltiples pinzas de sustrato 20A y/o 20B de la máquina 1 reciban un sustrato 2 de un impulsor de sustrato 120 (mostrado en la FIG. 5) de manera que una muestra dispuesta en el sustrato 2 se pueda preparar con la máquina 1, y también de manera que, una vez preparada, la pinza de sustrato 20A y/o 20B pueda proporcionar el sustrato 2 que tiene una muestra preparada, que se puede proporcionar al impulsor de sustrato 120 para el procesamiento de la muestra.

Para las máquinas que tienen dos plataformas 60A y 60B, como en la forma de realización ilustrada, los sustratos 2 se proporcionan normalmente, y desde, el impulsor de sustrato 120 de una manera alternativa. En algunas formas de realización, se proporciona un primer sustrato 2 desde el impulsor de sustrato 120 hasta una primera pinza de sustrato 20A, para ser procesado en una primera plataforma 60A, mientras que la máquina 1 está en una primera posición. Mientras que el primer sustrato 2 se procesa en la primera plataforma 60A, el mecanismo de indexación 50A puede trasladar la máquina 1 a una segunda posición de manera que una segunda pinza de sustrato 20B pueda recibir un segundo sustrato, para ser procesado en la segunda plataforma 60B, desde el impulsor de sustrato 120. Mientras que el segundo sustrato se procesa en la segunda plataforma 60B, el mecanismo de indexación 50A puede trasladar la máquina 1 de vuelta a la primera posición, de manera que el impulsor de sustrato 120 pueda retirar el primer sustrato 2 de la primera pinza de sustrato 20A. Una vez que el sustrato 2 se retira de la primera plataforma de sujeción 20A, se puede proporcionar un siguiente sustrato a la primera plataforma de sujeción 20A. Este método para proporcionar sustratos a plataformas de sujeción alternas se puede implementar para más de dos (por ejemplo, tres, cuatro, cinco o más de cinco) plataformas, aumentando de este modo el rendimiento de las muestras preparadas para una evaluación más en detalle.

Las plataformas 60A y 60B se forman normalmente a partir de uno o más materiales que son relativamente inertes químicamente con respecto a los fluidos utilizados durante el procesamiento de la muestra y proporcionan una tensión superficial adecuada. Los materiales de ejemplo que se pueden utilizar para formar las plataformas 60A y 60B incluyen termoplásticos de ingeniería, tales como el polioximetileno (por ejemplo, Delrin® fabricado por DuPont), fluorocarburos de alto peso molecular, como el politetrafluoroetileno (PTFE) (por ejemplo, Teflon® fabricado por DuPont), y metales como el aluminio, el acero y el titanio, siempre que estén fabricados y/o tratados para proporcionar una tensión superficial adecuada que actúe para ayudar a distribuir y confinar uniformemente los fluidos de procesamiento en el espacio entre el sustrato 2 y las plataformas, y también permitir la adecuada evacuación de los fluidos de procesamiento. Al seleccionar los materiales adecuados, las plataformas también

pueden reducir o minimizar de forma ventajosa la formación de burbujas o espacios dentro de los fluidos a medida que se distribuyen, y al mismo tiempo mantener una tensión superficial suficiente de manera que la fuga de fluido fuera de la separación entre las plataformas y el sustrato 2 se reduzca o elimine.

5 En general, el área superficial de las plataformas 60A y 60B se puede seleccionar según se desee para los fines de manipulación de sustrato y suministro de fluido. Factores tales como el área superficial de las plataformas 60A y 60B también pueden influir en el área superficial seleccionada del sustrato 2. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el área superficial de la plataforma 60A (por ejemplo, el área de la superficie de la plataforma 60A que está orientada hacia el sustrato 2) es ligeramente más pequeña que el área de la superficie del sustrato 2 que está orientada hacia la plataforma 60A. Al mantener una relación de este tipo entre las áreas de las superficies
10 enfrentadas de la plataforma 60A y el sustrato 2, se puede reducir o eliminar la fuga de fluido de la región entre las superficies. Normalmente, por ejemplo, el área de la superficie del sustrato 60A que está orientada hacia el sustrato 2 es más pequeña que el área de la superficie del sustrato 2 en un 2% o más (por ejemplo, 3% o más, 5% o más, 7% o más, 10% o más, 15% o más, 20% o más, 25% o más, 30% o más).

15 Las plataformas 60A y 60B se pueden unir a los bloques 80A y 80B, respectivamente. El bloque 80A incluye lados laterales 81A-84A que soportan un lado superior 85A según se muestra en la FIG. 2. Los bloques 80A y 80B se pueden fabricar de materiales iguales o similares a los utilizados para las plataformas, que incluyen metales, cerámica y/o plásticos. Por lo tanto, se pueden utilizar materiales como Delrin® para formar los bloques 80A y 80B, particularmente en formas de realización que implementen la tinción de Romanowsky de muestras. Otros materiales que se pueden utilizar en las formas de realización incluyen metales y aluminio, acero o titanio recubiertos con politetrafluoroetileno de marca Teflon®.
20

En algunas formas de realización, las plataformas 60A y/o 60B se puede elevar según se muestra en las FIG. 1-3. Alternativamente, en determinadas formas de realización, las plataformas 60A y/o 60B pueden estar a ras con la superficie superior de los bloques 80A y 80B, respectivamente. En cualquier caso, determinadas características de la máquina 1, así como la tensión superficial de los fluidos y la energía superficial de la plataforma o bloque evitan
25 que el exceso de fluidos fluya por los bordes de las plataformas 60A/60B y/o bloques 80A/80B.

Según se muestra en las FIG. 1 y 2, la plataforma 60A puede incluir separadores 70A-70D para proporcionar una separación entre la superficie de la plataforma 60A y el sustrato 2, y evitar que el sustrato 2 entre en contacto con la plataforma 60A. La plataforma 60B puede incluir un conjunto correspondiente de separadores 71A-71D. Los separadores pueden incluir distanciadores, pasadores, varillas, barras, molduras, paredes u otras estructuras que proporcionan separación entre la superficie de la plataforma 60A y/o 60B y el sustrato 2. Los separadores 70A-70D y 71A-71D garantizan que las superficies de las plataformas 60A y 60B y el sustrato 2 permanezcan, en esencia,
30 paralelas cuando el sustrato 2 hace contacto con los separadores. La ventaja de mantener estas dos superficies en paralelo es que el volumen encerrado entre estas dos superficies se define de este modo y se puede controlar con precisión. Si las dos superficies no son, en esencia, paralelas, y el ángulo entre ellas cambia, entonces el volumen entre ellos también cambia y no se fija ni se controla con precisión. Además, los fluidos se pueden aplicar no uniformemente a la muestra si dichas dos superficies no son, en esencia, paralelas.
35

Según se utiliza en la presente memoria, la frase "en esencia, paralelas" significa que dos superficies son exactamente paralelas o casi paralelas, de manera que las imperfecciones en la planitud de la superficie del sustrato 2 se reduzca o elimine cuando el sustrato 2 hace contacto con los separadores. Por ejemplo, aunque se toma mucho cuidado en la producción de sustratos, determinados sustratos pueden tener imperfecciones tales como retorcidos y/o esquinas no coplanares. En los sistemas y métodos descritos en la presente memoria, la utilización de separadores ayuda a corregir estas imperfecciones al mejorar la planitud de la superficie del sustrato 2 cuando sea necesario, orientando el sustrato 2 con una relación, en esencia, paralela a las plataformas 60A y 60B en el proceso. La frase "en esencia paralela" cubre situaciones en las que los dos las superficies no son perfectamente planas, pero los separadores son todos del mismo tamaño o altura, de manera que al menos los puntos de contacto de una superficie del sustrato con los separadores están en el mismo plano.
40
45

La FIG. 6A muestra el sustrato 2 con la muestra 3 (muestra no mostrada), la pinza de sustrato 20B, los bloques 80A, 80B, las plataformas 60A, 60B, los separadores 70A-70D y 71A-71D, y la separación 92 entre el sustrato 2 y la plataforma 60B. La separación 92 permite que los fluidos se desplacen entre la superficie de la plataforma 60B que contiene los orificios 40B-45B y el sustrato 2 que contiene la muestra 3. La distancia de separación requerida para la fijación, la tinción y el aclarado óptimo de la muestra variará dependiendo del caudal de los fluidos dispensados desde los orificios 40B-45B (y/o orificios 40A-45A), el diámetro de los orificios, la viscosidad de los fluidos aplicados durante el procesamiento y la cantidad de succión disponible para retirar los fluidos del sustrato, la separación y la plataforma.
50

55 En algunas formas de realización, por ejemplo, Los separadores que proporcionan una separación 92 de aproximadamente 100-200 micras entre la superficie de la plataforma 60B y el sustrato 2 permiten la fijación, la tinción y el aclarado de muestras que comprenden células sanguíneas en formas de realización capaces de dispensar fluidos a caudales que varían de 70 a 140 microlitros por segundo (por ejemplo, 90, 115 o 125 microlitros por segundo) desde los orificios 40B-45B que tienen un diámetro que varía de 500 a 1.500 micras. En general, el tamaño o altura de separación 92 puede variar desde aproximadamente 50 micras hasta 1.000 micras para
60

determinadas formas de realización (por ejemplo, desde aproximadamente 50 hasta 500 micras, desde aproximadamente 75 hasta 250 micras, desde aproximadamente 100 hasta 200 micras), siempre que dichas formas de realización sean capaces de superar la tensión superficial de los fluidos en la separación mientras dispensan y retiran el fluido durante el procesamiento de la muestra. Además, en determinadas formas de realización, los diámetros de los orificios situados en la plataforma 60A y/o 60B pueden variar desde aproximadamente 125 micras hasta 5.000 micras.

Las FIG. 6B y 6C muestran un mecanismo de articulación de rótula 25 que se puede utilizar para alinear una pinza de sustrato 20A para que sea paralela a una plataforma 60A. El mecanismo de articulación de rótula 25 puede incluir un elemento de rótula 25A que se fija rígidamente a la pinza de sustrato 20A, un elemento de desviación 25B (por ejemplo, un resorte), un zócalo inferior 25C que se conecta rígidamente al brazo de sustrato 10A, un zócalo superior 25D, una tapa 25E que se fija al zócalo inferior 25C (por ejemplo, mediante sujetadores), y un tornillo de ajuste 25F. En algunas formas de realización, durante la fabricación y/o configuración de la máquina 1 y las pinzas de sustrato 20A y/o 20B, el mecanismo de articulación de rótula 25 se puede ajustar para compensar cualquier desalineación que pueda estar presente debido a problemas de fabricación o tolerancias de apilamiento. Para ajustar el mecanismo de articulación de rótula 25, en algunas formas de realización, el tornillo de ajuste 25F se afloja y el brazo de sustrato 10A se mueve a la posición cerrada. Dado que el tornillo de ajuste 25F se afloja, la pinza de sustrato 20A, mientras agarra un sustrato 2, es capaz de quedar, en esencia, paralela a la plataforma 60A mientras que el sustrato 2 se coloca a lo largo de los separadores de contacto 70. Alternativamente, en algunas formas de realización, el número de separadores en la plataforma 60 se puede reducir o eliminar por completo; un calzo con un grosor correspondiente a la distancia de separación deseada se puede utilizar temporalmente durante la configuración o calibración de la máquina 1 junto con el mecanismo de articulación de rótula 25 para configurar la separación 92 a una distancia deseada para el procesamiento de la muestra. Aunque el mecanismo de articulación de rótula 25 se afloje, el elemento de desviación 25B aplica una fuerza para mantener la pinza de sustrato 20A semifija al brazo de sustrato 10A de manera que se pueda mover de forma independiente, pero no está tan suelta ni tan libre para moverse tanto como para interferir o causar daños a, otros componentes de la máquina 1. Una vez que el sustrato 2 se presiona firmemente en una posición cerrada de manera que el sustrato 2 esté, en esencia, paralelo a la plataforma 60A, el tornillo de ajuste 25F se puede apretar para asegurar el mecanismo de articulación de rótula 25. Según se muestra, cuando se aprieta, el tornillo de ajuste 25F aplica una fuerza hacia abajo en el zócalo superior 25D y, por lo tanto, aplica una fuerza de fricción a la parte superior del elemento de rótula 25A a través del zócalo superior 25D. Dado que el zócalo inferior 25C está fijado a la tapa 25E, la fuerza creada por el tornillo de ajuste 25F también levanta el zócalo inferior 25C de manera que el zócalo inferior 25C aplica una fuerza de fricción al lado inferior del elemento de rótula 25A para limitar el elemento de rótula 25A dentro de los zócalos superior e inferior 25C, 25D. Una vez limitado al elemento de rótula 25A, la pinza de sustrato 20A se vuelve fija con el brazo de sustrato 10A.

Normalmente, una vez que la pinza de sustrato 20A se coloca y limita con el tornillo de ajuste 25F, el mecanismo de articulación de rótula 25 no necesita ser ajustado de nuevo durante la utilización normal. Sin embargo, si la pinza de sustrato 20A se desalinea y, por lo tanto, el mecanismo de articulación de rótula 25 requiere un ajuste (por ejemplo, debido a daños, reparación de la máquina, mal desempeño u otras razones), el tornillo de ajuste 25F se puede aflojar, la pinza de sustrato 20A se puede mover a una posición cerrada para colocarla de manera que un sustrato agarrado mediante la pinza de sustrato 20A sea, en esencia, paralelo a la plataforma 60A, y a continuación el tornillo de ajuste 25F se puede apretar para asegurar el mecanismo de articulación de rótula 25.

En general, los actuadores 30A y/o 30B se pueden configurar para ajustar la posición de brazos sustrato 10A y/o 10B para variar el grado de separación entre la superficie de las plataformas 60A y/o 60B y el sustrato 2. La variación de esta separación proporciona mayor flexibilidad en las formas de realización que permiten ajustar los fluidos asignados a cada orificio, los caudales, las viscosidades de los fluidos y las fuerzas de evacuación de las plataformas 60A y/o 60B. Por ejemplo, una separación 92 de 100 micras puede proporcionar suficiente fijación, tinción y aclarado de la muestra cuando los fluidos aplicados desde la plataforma 60A se dispensan con un caudal de 70 microlitros por segundo desde los orificios 40A-45A que tienen diámetros de orificio que varían desde 500 hasta 1.500 micras. Alternativamente, con una distancia de separación 92 entre la superficie de la plataforma 60A y el sustrato 2 de aproximadamente 200 micras, se puede utilizar un caudal más alto para los fluidos dispensados desde los orificios 40A-45A, tal como 115-140 microlitros por segundo, para el procesamiento de la muestra.

Según se describe anteriormente, la máquina 1 puede contener una serie de orificios y tubos para la dispersión y la retirada de los fluidos aplicados durante el procesamiento de la muestra. La siguiente descripción describe varios orificios, tubos y otros componentes asociados con la plataforma 60A, pero consideraciones similares se aplican a la plataforma 60B y sus componentes asociados. La FIG. 2 muestra una vista de cerca del aparato mostrado en la FIG. 1, y muestra en detalle los orificios 40A-45A en la plataforma 60A y los tubos 50A-55A conectados al bloque 80A. Los tubos 52A-55A distribuyen determinados fluidos, que incluyen uno o más agentes de fijación, colorantes y soluciones de aclarado a través de la plataforma, dentro de la separación y sobre el sustrato.

Con referencia a la FIG. 2, el lado superior de la plataforma 60A incluye seis orificios 40A-45A que se conectan a los tubos 50A-55A. Los fluidos son impulsados por una o más bombas a través de los tubos y los orificios sobre el sustrato 2. Uno o más depósitos de fluido 210A-213A (tales como un primer depósito de colorantes 211A, un segundo depósito de colorantes 212A, un depósito de agente de fijación 210A y un depósito de solución de aclarado

213A), por ejemplo, según se muestra en la FIG. 4, puede dirigir el fluido sobre la plataforma 60A y el sustrato 2. Los diámetros de los orificios 40A-45A mostrados en las FIG. 1-3 varían desde aproximadamente 500 micras hasta 1.500 micras, aunque los diámetros también pueden ser más pequeños o más grandes en determinadas formas de realización. En algunas formas de realización, los diámetros de los orificios de vacío 40A y 41A son más del doble de los diámetros de los orificios de fluido 42A-45A.

Cada uno de los orificios 40A-45A se dedica normalmente a un fluido particular o fuente de vacío. Alternativamente, se puede utilizar más de un orificio para cada fuente de fluido o vacío, o se pueden conectar múltiples tubos de varias fuentes de fluido y vacío a un solo orificio situado en plataforma 60A. Por ejemplo, en algunas formas de realización, solo se puede utilizar un orificio en la plataforma 60A para la retirada de desechos, pero cuando se utilizan fluidos más viscosos, el orificio único puede no proporcionar suficiente succión para evacuar el fluido residual de la plataforma. Por lo tanto, puede ser deseable en determinadas formas de realización proporcionar dos orificios de succión en diferentes posiciones en la plataforma (por ejemplo, un orificio de succión en cada extremo de la plataforma) para retirar el exceso de fluidos colorante, agente de fijación y de aclarado según se muestra con los orificios 40A y 41A en la FIG. 2. Destacando aún más la variabilidad de las configuraciones de fluido a orificio, en determinadas formas de realización, un orificio único en la plataforma 60A se puede dedicar para un colorante particular, mientras que en otras formas de realización se utilizan múltiples orificios para aplicar los colorantes durante el procesamiento de la muestra. De hecho, se pueden utilizar varias combinaciones relacionadas con el número de orificios, las ubicaciones de los orificios y los fluidos asignados a cada orificio y tubo de fluido en diferentes formas de realización de la invención.

Los orificios 40A-45A generalmente se pueden colocar como se desee en la plataforma 60A para proporcionar el suministro de fluido y la retirada del fluido del sustrato 2. Por lo general, cada uno de los orificios de fluido se coloca en la plataforma 60A de manera que la abertura del orificio no se coloque directamente adyacente o debajo de la muestra 3 en el sustrato 2 cuando la muestra se somete al procesamiento. Con determinadas combinaciones de muestras y colorantes, por ejemplo, si los colorantes se dispensan desde un orificio situado directamente adyacente o debajo de una parte de la muestra 3, se puede aplicar una mayor cantidad de tinción a las células en esa parte (en la proximidad del orificio) que a las células en otras partes de la muestra. Como resultado, las células que reciben la mayor cantidad de colorante pueden aparecer más oscuras en las imágenes de la muestra, y esta tinción no uniforme de las células de la muestra puede complicar la evaluación manual y automatizada de la muestra e introducir errores en las mediciones de diagnóstico y los resultados analíticos basados en las imágenes. Por lo tanto, los orificios de fluido que administran el colorante a la muestra 3 se pueden separar una cierta distancia del área que contiene la muestra de un portaobjetos para mejorar los resultados de la tinción.

Además, la utilización de pares de orificios, por ejemplo, múltiples pares de orificios, situados uno enfrente del otro, puede también mejorar la uniformidad de tinción. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se utilizan dos orificios para administrar el colorante a la muestra 3. Los dos orificios se pueden situar en la plataforma 60A en posiciones separadas una cierta distancia (por ejemplo, están desplazadas) de los bordes de la muestra 3, y se pueden situar uno enfrente del otro en una dirección paralela a los bordes cortos de la plataforma 60A. Cuando el colorante se dispensa desde los dos orificios separados, se deposita una cantidad relativamente uniforme de colorante sobre las células en las diferentes regiones de la muestra 3, y se observa una homogeneidad de tinción mejorada en las imágenes de la muestra.

De manera similar, mientras que los orificios 40A-45A generalmente se pueden colocar como se desee para retirar el exceso de fluidos de la superficie del sustrato 2 utilizando una o más fuentes de vacío, en algunas formas de realización los orificios que se utilizan para la retirada de fluidos se separan a una distancia de las posiciones en la plataforma 60A que están directamente debajo de las células dentro de la muestra 3 en el sustrato 2. La colocación de los orificios de retirada de desechos de esta manera (es decir, no directamente enfrente de una parte de la muestra 3) reduce las posibilidades de que cuando dichos orificios se accionen para evacuar los fluidos del sustrato 2, las células de la muestra 3 se dañen involuntariamente o sean arrastradas dentro de los orificios de retirada de fluido. En determinadas formas de realización, debido a la diferencia en las longitudes de los lados largos y cortos de la plataforma 60A, los orificios de retirada de desechos se separan del borde del área de la muestra y se disponen uno enfrente del otro a lo largo de una dirección paralela a los bordes largos de la plataforma 60A.

50 Fases de fijación

Los tubos de fluido 52A-55A y 52B-55B se pueden colocar para administrar agente de fijación a las plataformas 60A y 60B, la separación 92, el sustrato 2, y la muestra 3 durante el procesamiento de la muestra. Los agentes de fijación que se pueden utilizar incluyen productos químicos utilizados para proteger las muestras biológicas de la descomposición, y dichos agentes de fijación pueden impedir que se produzcan reacciones bioquímicas en la muestra y aumentar la resistencia mecánica y la estabilidad de la muestra. Se pueden utilizar varios agentes de fijación, que incluyen, entre otros, metanol, etanol, isopropanol, acetona, formaldehído, glutaraldehído, EDTA, surfactantes, sales metálicas, iones metálicos, urea y compuestos amino.

Con referencia a la FIG. 4, uno o más tubos de fluido 52-55A se pueden conectar a un orificio dentro de la plataforma 60A y a un respectivo depósito de agente de fijación 210A. Los tubos de fluido también pueden incluir una conexión a una bomba 200A y/o una válvula capaz de dirigir los agentes de fijación desde el depósito a través

del tubo y un orificio situado en la plataforma, y sobre un sustrato y una muestra. Como ejemplo, la bomba 200A puede dirigir el agente de fijación desde el depósito 210A a través del tubo 54A, a través del bloque 80A, fuera desde el orificio 44A, sobre la plataforma 60A, dentro de la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2, y sobre el sustrato 2 que contiene la muestra 3. Después la aplicación de una cantidad específica de agente de fijación al sustrato 2, un vacío u otra fuente de succión 220A y/o 221A puede evacuar el agente de fijación residual de la plataforma 60A, la separación 92, y el sustrato 2 en el contenedor de desechos 230A y/o 231A a través de uno o más de los orificios 40A y/o 41A a través de los tubos de desecho 50A y 51A.

La FIG. 9 muestra un diagrama de flujo 700 que incluye una serie de etapas para aplicar el agente de fijación a una muestra. En la etapa 702, una bomba (por ejemplo, la bomba 200A) dirige el agente de fijación (por ejemplo, metanol) desde un depósito (por ejemplo, el depósito 210A) dentro de un tubo de agente de fijación (por ejemplo, el tubo 54A). En la etapa 704, el agente de fijación se dirige al orificio 44A unido al bloque 80A. A continuación, en la etapa 706, el agente de fijación se dirige fuera del orificio 44A en la plataforma 60A. En la etapa 708, el agente de fijación se dirige fuera a través del orificio 44A y dentro de la separación 92 entre el sustrato 2 y la plataforma 60A. Finalmente, en la etapa 710, la muestra 3 en el sustrato 2 se fija con la solución de agente de fijación.

En algunas formas de realización, la bomba 200A dirige el metanol a través del tubo 54A y el orificio 44A, sobre la plataforma 60A y dentro de la separación 92 con un caudal de 70 microlitros por segundo durante un período de cuatro segundos. Un vacío u otra fuente de succión 220A y/o 221A a continuación retira el metanol residual presente en la separación 92 y/o en la plataforma 60A y el sustrato 2 utilizando los orificios 40A y/o 41A y los tubos de desecho 50A y/o 51A (descritos con más detalle más adelante). A continuación, la bomba 200A puede dirigir nuevamente el metanol a través del tubo 54A y el orificio 44A, y sobre la plataforma 60A con un caudal de 70 microlitros por segundo durante un período de cuatro segundos, seguido de un segundo proceso de evacuación de fluido. Este proceso de fijación y evacuación se puede repetir nuevamente, utilizando el mismo o un agente de fijación diferente, dependiendo del tipo de muestra biológica que requiere fijación. Además, la máquina 1 es capaz de variar la frecuencia y los caudales para cada fase de fijación. También se pueden utilizar otros caudales suficientes para superar cualquier tensión superficial en el fluido situado en la separación 92 y fijar la muestra 3 para su procesamiento y evaluación con más detalle. Al ajustar la frecuencia y/o el caudal de las fases de fijación, la máquina 1 puede lograr una fijación óptima para varias muestras utilizando varios agentes de fijación diferentes. Las instrucciones de la máquina para diferentes tipos de muestras se pueden cablear o preprogramar en la unidad de control 5 y seleccionarse por un operador del sistema según sea necesario.

En general, se puede aplicar una amplia variedad de agentes de fijación a las muestras durante las fases de fijación. Por ejemplo, se puede utilizar un 85% de metanol como agente de fijación. Para algunos colorantes, se puede utilizar un alcohol etílico o un agente de fijación a base de formaldehído. Las formulaciones de agentes de fijación adicionales que se pueden utilizar para preparar la muestra se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente provisional de EE. UU. N.º 61/505.011.

35 Fases de tinción

La máquina 1 también incluye tubos y orificios configurados para aplicar uno o más tintes o colorantes a una muestra fijado a un sustrato en una o más fases de tinción. La tinción de una muestra aumenta el contraste de la muestra cuando se ve o se obtiene una imagen con un microscopio u otro dispositivo de formación de imágenes. Se pueden utilizar tinciones de Romanowsky y/u otros tintes o colorantes, incluidas la hematoxilina y la eosina, la fluoresceína, colorantes de tiazina utilizando anticuerpos, sondas de ácido nucleico y/o sales y iones metálicos. Las formulaciones de colorantes adicionales que se pueden utilizar para preparar la muestra se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente provisional de EE. UU. N.º 61/505.011.

La FIG. 10 es un diagrama de flujo 800 que incluye una serie de etapas para aplicar el colorante a una muestra. En la etapa 802, una bomba (por ejemplo, la bomba 201A) dirige el tinte o colorante desde un depósito (por ejemplo, el depósito 211A) dentro de un tubo de colorante (por ejemplo, el tubo 52A). En la etapa 804, el colorante se dirige dentro de un orificio (por ejemplo, el orificio 42A) unido al bloque 80A. A continuación, en la etapa 806, el colorante fluye fuera del orificio 42A en la plataforma 60A. En la etapa 808, el colorante fluye dentro de la separación 92 entre el sustrato 2 y la plataforma 60A y, acto seguido, en la etapa 810, se tiñe la muestra 3 sobre el sustrato 2.

En algunas formas de realización, se pueden utilizar múltiples tubos y orificios para aplicar el colorante a la muestra 3. Por ejemplo, una segunda bomba (por ejemplo, la bomba 202A) puede dirigir el colorante (por ejemplo, el mismo colorante o un colorante diferente del dispensado desde depósito 211A) desde el depósito 212A a través del tubo 53A y el orificio 43A y sobre la plataforma 60A. En determinadas formas de realización, dos o más tubos de fluido se pueden conectar a un depósito o bomba de colorante compartida y/o válvula utilizada para dirigir el colorante a través de los orificios y sobre la plataforma. Con referencia de nuevo a la FIG. 2, el tubo 52A puede administrar un colorante rojo, tal como un colorante de fluoresceína, a la plataforma, el sustrato 3 y la muestra 2. El tubo 53A puede administrar un colorante azul, tal como un colorante de tiazina. En las FIG. 1-6, las cantidades, ubicaciones y tamaños de los orificios en la plataforma 60A se seleccionan para optimizar la aplicación del colorante a una muestra fijada al sustrato. Si se seleccionan otros colorantes, una cantidad, ubicaciones y tamaños diferentes de orificios pueden ser preferibles dependiendo de la viscosidad del colorante.

Cada uno de los orificios 40A-45A (y 40B-45B) puede incluir tanto un canal de entrada para recibir fluido como un canal de salida para la salida de fluido. En algunas formas de realización, los canales de salida del aclarado 45A, el agente de fijación 44A y los orificios de tinción 42A-43A están en la superficie superior de la plataforma 60A, y los canales de entrada de los orificios de vacío 40A y 41A pueden estar en los extremos opuestos de la superficie superior de plataforma 60A. Los canales de entrada del aclarado 45A, el agente de fijación 44A y los orificios de tinción 42A-43A se pueden situar en el mismo lado lateral del bloque 80A, y los canales de salida de los orificios de vacío 40A y 41A se pueden colocar en los lados laterales opuestos del bloque 80A.

A modo de ejemplo y con referencia a las figuras. 2 y 10, el sistema de control 5 da instrucciones a una bomba (por ejemplo, bomba 201A) en la etapa 802 para dirigir un colorante (por ejemplo, un colorante que comprende un tinte de fluoresceína) desde un depósito de colorante dentro del tubo de fluido 52A. En la etapa 804, el colorante ingresa en el orificio 42A desde el tubo de fluido. A continuación, en la etapa 806, el colorante deja el orificio 42A con un caudal de 140 microlitros por segundo, durante un período de cinco segundos, y en la etapa 808, el colorante se deposita dentro de la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2 que contiene la muestra 3. En la etapa 810, la muestra 3 sobre el sustrato 2 se tiñe. Luego de la tinción, un vacío u otra fuente de succión (por ejemplo, las bombas 220 y/o 221) pueden a continuación evacuar el colorante residual presente en la separación 92, en la plataforma 60A y en el sustrato 3 utilizando los orificios 40A-41A y los tubos de desecho 50A-51A.

La máquina 1 se puede programar para repetir estas fases de tinción y evacuación después de un retardo (por ejemplo, un retardo de entre 3 segundos y 10 segundos, tal como un retardo de cinco segundos), después de la primera fase de tinción. El sistema de control 5 puede dar instrucciones a una segunda bomba 202A para dirigir el tinte de tiazina desde un depósito de colorante a través del tubo de fluido 53A, fuera del orificio 43A con un caudal de 140 microlitros por segundo, y sobre la plataforma 60A durante un período de tiempo, por ejemplo, tres segundos. Un vacío u otra fuente de succión (por ejemplo, la bomba 220A y/o 221) puede evacuar el tinte de tiazina residual presente en la separación 92 y/o en la plataforma 60A y/o en el sustrato 2 utilizando los orificios 40A-41A y los tubos de desecho 50A-51A. Al igual que con las fases de fijación, la máquina 1 es capaz de variar la frecuencia, los tiempos de retardo y los caudales para cada fase de tinción. El caudal puede variar, por ejemplo, desde 70 hasta 140 microlitros por segundo, o puede ser menor o mayor que los límites externos de este intervalo (por ejemplo, de 10 a 500 microlitros por segundo) siempre que el caudal sea suficiente para superar cualquier tensión superficial presente en el fluido situado en la separación 92 y deseablemente teñir la muestra para la evaluación prevista.

Los colorantes de ejemplo que se pueden aplicar a muestras incluyen, entre otros: colorante Wright-Giemsa, colorantes de Giemsa y los colorantes de Romanowsky. Otros agentes tales como reactivos inmunocitoquímicos u otros marcadores de componentes celulares específicos también se pueden aplicar a muestras.

Retirada de fluidos de desecho

Como se mencionó anteriormente, un vacío u otra fuente de succión 220 y/o 221 pueden evacuar el fluido residual del sustrato 2, la separación 92 y la plataforma 60A durante o entre las fases de fijación y tinción. Con referencia a la FIG. 1, se pueden conectar uno o más tubos de desecho a los lados 82A y 84A del bloque 80A. Los tubos de desecho o vacío 50A y 51A se utilizan para extraer el fluido y la materia en partículas pequeñas de la plataforma 60A, la separación 92 y el sustrato 2 dentro de un contenedor de desechos u otra ubicación separada de la máquina 1. Con referencia a la FIG. 2, los tubos de desecho 51A y 51B se pueden conectar a fuentes de vacío diferentes 220 y 221, y los contenedores de desecho 230 y 231, en los extremos distales de los tubos de desecho. Alternativamente, se pueden conectar dos o más tubos de desecho a una sola fuente de vacío, y al mismo contenedor de desechos, según se muestra en la FIG. 4. Los tubos de desecho 50A y 50B se pueden extender a través de las válvulas de estrangulamiento 90A y 90B, respectivamente.

Se puede conectar un vacío u otra fuente (por ejemplo, la bomba de vacío 220 y/o 221) para aplicar succión a uno o más de los tubos de desecho 50A, 50B, 51A y 51B para extraer el fluido de las plataformas 60A y/o 60B, la separación 92, y el sustrato 2 dentro de los contenedores de desechos 230 y 231. La fuerza de vacío aplicada dentro de los tubos de desecho puede ser equivalente a uno negativo hasta diez libras por pulgada cuadrada negativas ("psi") para proporcionar suficiente succión para retirar los fluidos cuando la separación entre el sustrato 2 y la plataforma está entre 100 y 200 micras. En general, según se utiliza en la presente memoria, la presión "negativa" se refiere a una presión menor que la presión ambiental dentro de la máquina 1 o el entorno que rodea a la máquina 1. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el entorno que rodea a la máquina 1 tiene una presión del aire ambiente de aproximadamente una atmósfera. Las presiones "negativas" se refieren a presiones que son menores que esta presión del aire ambiente (por ejemplo, una presión de un psi negativo aplicada a un fluido es una presión de un psi menor que la presión del aire ambiente ejercida sobre el fluido). Otros vacíos varían desde 0,1 psi a 14 psi negativos (por ejemplo, seis psi negativos), o más, se pueden utilizar siempre que dichos vacíos sean suficientes para superar cualquier tensión superficial en el fluido presente en la separación y eliminar todo el fluido residual en la separación y sobre el sustrato y la muestra. Además, inmediatamente antes de aplicar vacío para evacuar los fluidos de la separación, el actuador 30A puede elevar el borde próximo del sustrato 2 a una distancia de 15-35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra. Esta mayor separación entre el sustrato 2 y la plataforma 60 puede mejorar la evacuación de cualquier fluido residual en la separación 92 durante una fase de vacío.

En algunas formas de realización, el sistema de control 5 se configura para variar la frecuencia y el vacío aplicado para la retirada de fluido durante el procesamiento de la muestra. La FIG. 11A incluye un diagrama de flujo 900 que presenta una serie de etapas para retirar el exceso de fluido de un sustrato. Después de una fase de fijación, por ejemplo, el sistema de control 5 puede abrir las válvulas de estrangulamiento 90A y/o 90C en la etapa 902 y aplicar un vacío de 5 psi negativos en los tubos de desecho (por ejemplo, tubos de desecho 50A y 51A) durante un período de cinco segundos. Durante este período, el agente de fijación se retira (etapa 904) de la separación, el sustrato y la plataforma a través de los orificios 40A y 41A. El fluido se desplaza a través de los tubos de desecho en la etapa 906 y se deposita en uno o más contenedores de desechos (por ejemplo, los contenedores 230 y/o 231) en la etapa 908. Una vez que el período de evacuación expira, el sistema de control 5 puede dar instrucciones a uno o más válvulas de estrangulamiento 90A, 90C para cerrar los tubos de desecho 50A y/o 51A en la etapa 910, evitando de este modo una mayor evacuación por el vacío 220-221. El sistema de control 5 puede dirigir a la máquina 1 para repetir esta etapa de retirada de fluido después de cada fase de fijación.

La FIG. 11B incluye un diagrama de flujo 1000 que presenta una serie alternativa de etapas para retirar el exceso de fluido de un sustrato. El método en el diagrama de flujo 1000 no utiliza válvulas de estrangulamiento para sellar tubos de desecho. En cambio, después de una fase de aplicación de fluido, la fuente de succión 220 y/o 221 se inicializan en la etapa 1002 y entran en un estado activo en la etapa 1004. La fuente de succión aplica un vacío de 3 psi negativos en los tubos de desecho 50A y/o 51A durante un período de cuatro segundos para retirar el fluido de la separación 92, el sustrato 2 y la plataforma 60A a través de los orificios 40A y 41A en la etapa 1006. El fluido evacuado se desplaza a través de los tubos de desecho 50A y/o 51A en la etapa 1008, y se deposita en uno o más contenedores de desechos 230, 231 en la etapa 1010. La máquina 1 puede repetir esta etapa de retirada de fluido después de cada fase de aplicación de fluido. Al variar la frecuencia y la presión aplicadas durante las etapas de retirada de fluido, la máquina 1 puede lograr una fijación, tinción y aclarado óptimas de las muestras biológicas.

Las válvulas de estrangulamiento 90A, 90B, 90C y 90D cierran los tubos de desecho 50A, 50B, 51A y 51B, según se muestra en la FIG. 1. Las válvulas de estrangulamiento 90A-90D se pueden accionar mecánica, eléctrica, hidráulica o neumáticamente a través de actuadores contenidos dentro o fuera de las válvulas. Las válvulas de estrangulamiento 90A-90D funcionan para impedir el flujo de fluido a través de los tubos de desecho 50A, 50B, 51A y 51B. Por ejemplo, al cambiar o vaciar un contenedor de desechos lleno 230 de la máquina 1, puede ser conveniente cerrar las válvulas de estrangulamiento (90A-90D) para evitar la fuga de fluidos residuales presentes en los tubos de desecho. Se pueden utilizar diferentes tipos de válvulas u otros mecanismos tales como abrazaderas o tapones con formas de realización de la máquina 1 para cerrar los tubos de desecho 50A, 50B, 51A y 51B.

Fases de aclarado

Las soluciones de aclarado se pueden aplicar durante el procesamiento de la muestra con la máquina 1 en una o más fases de aclarado. Por ejemplo, puede ser deseable retirar los fluidos residuales y/o en exceso de la muestra 3 en el sustrato 2, la separación 92 y las plataformas 60A y/o 60B entre las fases de fijación, entre las fases de tinción y/o entre las fases de fijación y tinción. Las soluciones de aclarado compatibles con los sistemas y métodos actuales incluyen agua destilada; soluciones acuosas tamponadas; disolventes orgánicos; y mezclas de disolventes acuosos y orgánicos, con o sin tamponamiento. Las formulaciones adicionales para soluciones de aclarado que se pueden utilizar para preparar la muestra se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente provisional de EE. UU. N.º 61/505.011.

La FIG. 12 incluye un diagrama de flujo 1100 con una serie de etapas para aclarar una muestra. En la etapa 1102, una bomba (por ejemplo, la bomba 203A) dirige la solución de aclarado (por ejemplo, que comprende agua destilada) desde un depósito (por ejemplo, el depósito 213A) dentro de un tubo de aclarado (por ejemplo, el tubo de aclarado 55A). En la etapa 1104, la solución de aclarado ingresa al orificio 45A conectado al bloque 80A. En la etapa 1106, la solución de aclarado fluye sobre la plataforma 60A a través del canal de salida del orificio 45A, y en la etapa 1108, la solución de aclarado ingresa en la separación 92 entre el sustrato 2 y la plataforma 60A. En la etapa 1110, se realiza el aclarado de la muestra 3. Finalmente, en la etapa 1112, una fuente de vacío 220, 221 aplica succión a uno o más de los tubos de desecho 50A y 51A para retirar la solución de aclarado de la separación 92 y el sustrato 2; la solución de aclarado se transporta al contenedor de desechos 230 y/o 231.

En algunas formas de realización, el sistema de control 5 puede dirigir la bomba 203A para aplicar la solución de aclarado con un caudal de, por ejemplo, 70 microlitros por segundo durante un período de, por ejemplo, cinco segundos. Al igual que con las fases de fijación, el sistema de control 5 puede variar la duración y el caudal de cada fase de aclarado y la cantidad de fases de aclarado. Además, el sistema de control 5 puede ajustar la colocación de una o más fases de aclarado durante el procesamiento de la muestra. El sistema de control 5 puede, por ejemplo, dirigir que se produzca una fase de aclarado una vez, después de completar todas las fases de fijación, y que una segunda fase de aclarado se produzca una vez, después de completar todas las fases de tinción. Alternativamente, las fases de aclarado se pueden intercalar entre dos o más fases de fijación o entre dos o más fases de tinción.

Fases de agitación

El procesamiento de la muestra en determinadas formas de realización puede incluir una o más fases de agitación para dispersar los fluidos agentes de fijación, de tinción y/o de aclarado a lo largo de la separación 92, el sustrato 2

que contiene la muestra 3 y las plataformas 60A y/o 60B durante las fases de fijación, tinción y/o aclarado. La FIG. 13 incluye el diagrama de flujo 1200 que presenta una serie de etapas para agitar una muestra. El actuador 30A y/o 30B, mostrado en la FIG. 3A, puede proporcionar un ajuste de movimiento fino para cambiar la posición del sustrato 2 con respecto a la plataforma 60A y/o 60B.

5 El sistema de control 5 puede incluir software y/o hardware para dar instrucciones al actuador 30A y/o 30B para iniciar una fase de agitación. El actuador 30A y/o 30B se puede configurar para mover el brazo de sustrato 20A y/o 20B hacia arriba y hacia abajo con un comando de inicio de agitación desde el sistema de control. La fase de agitación puede repetirse durante un número predeterminado de ciclos de agitación. El término "ciclo de agitación", según se utiliza en la presente memoria, se refiere al movimiento desde una posición inicial en una dirección hacia arriba, seguido por un movimiento en una dirección hacia abajo opuesta a la dirección hacia arriba. En algunas formas de realización, uno o más ciclos de agitación devuelven el sustrato 2 a la posición inicial al final de cada ciclo, o al menos al final de algunos ciclos. En determinadas formas de realización, el sustrato 2 no regresa a la posición inicial al final de algunos o todos los ciclos de agitación, pero cada ciclo incluye todavía un movimiento hacia arriba seguido de un movimiento hacia abajo. El actuador 30A y/o 30B generalmente continúa moviendo el sustrato 2 en uno o más ciclos de agitación hasta que se envía una orden de parada al actuador desde el sistema de control 5. Una fase de agitación puede aumentar temporalmente el tamaño de separación (distancia de separación) entre el sustrato 2 y la superficie de la plataforma 60A y/o 60B, y a continuación regresar el sustrato a la posición de procesamiento de la muestra. Además, una fase de agitación puede incluir una serie de movimientos que desplazan el sustrato 2 entre una posición angular con respecto de la plataforma 60A y/o 60B y la posición de procesamiento de la muestra. La tensión superficial en los fluidos dispensados dentro de la separación entre la plataforma y el sustrato 2 provoca una redistribución de las moléculas de fluido en el sustrato cuando el sustrato se mueve desde la posición de procesamiento de la muestra durante la fase de agitación y puede mejorar ventajosamente la distribución de fluido a través de la muestra.

25 Otros métodos también se pueden utilizar para mover sustrato 2 con relación a las plataformas durante las fases de agitación. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las posiciones de uno o más de los separadores 70A-D y/o 71A-D (por ejemplo, la cantidad en que los separadores se extienden por encima de las superficies de las plataformas 60A y/o 60B) se pueden ajustar rápidamente para agitar la muestra 3. En determinadas formas de realización, las posiciones de las plataformas 60A y/o 60B se pueden ajustar para provocar la agitación de la muestra 3. Por ejemplo, las plataformas 60A y/o 60B se pueden mover alternativamente hacia arriba y hacia abajo (por ejemplo, en correspondencia con la dirección del movimiento del sustrato 2 descrito anteriormente) para provocar la agitación de la muestra 3.

En algunas formas de realización, la agitación de la muestra 3 se puede efectuar mediante la variación de la medida en que actuador 30A y/o 30B impulsa sustrato 2 hacia los separadores 70A-D y/o 71A-D, cuando los brazos de sustrato están fabricados de un material que se flexiona, como se describe a continuación. Los medidores de tensión se pueden utilizar para medir y ajustar la frecuencia de la agitación aplicada al sustrato 2 al detectar la variación en la tensión en los brazos de sustrato en función del tiempo.

Con referencia a la FIG. 13, en una primera etapa 1202, se inicia una fase de agitación. En la etapa 1204, el sistema de control 5 da instrucciones al actuador 30A para que comience un ciclo de agitación. En respuesta a esta instrucción, el actuador 30A hace girar el sustrato 2 hacia arriba en la etapa 1206, aumentando la distancia entre el sustrato 2 y la plataforma 60A. A continuación, en la etapa 1208, el actuador 30A gira el sustrato 2 hacia abajo hacia la plataforma 60A, reduciendo la distancia entre el sustrato y la plataforma 60A. En la etapa de decisión 1210, si la fase de agitación va a continuar, el control regresa a la etapa 1204 y la rotación del sustrato 2 por el actuador 30A vuelve a ocurrir en otro ciclo de agitación. Si la fase de agitación va a terminar, entonces el control pasa desde la etapa 1210 a la etapa 1212, donde el sustrato 2 vuelve a su posición inicial con la agitación finalizada.

45 La fase de agitación puede incluir uno o más ciclos de agitación aplicados a través del actuador 30A y/o 30B. Además, las fases de agitación se pueden producir una o varias veces durante cada una de las fases de fijación, tinción y/o aclarado y en frecuencias variables entre cada una de las fases de fijación, tinción y/o aclarado. Por ejemplo, y con referencia a la FIG. 3A, el actuador 30A y/o 30B pueden elevar el borde próximo del sustrato 2 verticalmente una distancia de 35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra y, posteriormente, devolver el sustrato 2 a la posición de procesamiento de la muestra tres veces, una vez después de cada fase de fijación, tinción y aclarado. El actuador 30A y/o 30B pueden completar cada ciclo de agitación en dos segundos (por ejemplo, un segundo para elevar el borde próximo del sustrato 2 verticalmente una distancia de 35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra y un segundo para devolver el sustrato a la posición de procesamiento de la muestra). La máquina 1 es capaz de llevar a cabo instrucciones para variar la frecuencia de agitación y la distancia para cada ciclo y/o fase de agitación. Por ejemplo, una fase de agitación puede incluir un actuador 30A y/o 30B que eleve el borde próximo del sustrato 2 verticalmente una distancia de 5 micras desde la posición de procesamiento de la muestra y a continuación devuelva el sustrato a la posición de procesamiento de la muestra, de 10 a 20 veces por segundo.

Se pueden utilizar también combinaciones alternativas de distancias y frecuencias de agitación. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la distancia de agitación es de 5 micras o más (por ejemplo, 15 micras o más, 25 micras o más, 50 micras o más, 100 micras o más, 150 micras o más, 200 micras o más, 250 micras o más, 300

micras o más, 500 micras o más, 700 micras o más, 1 mm o más). Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la distancia de agitación está entre 35 micras y 350 micras.

5 En algunas formas de realización, la frecuencia del ciclo de agitación es un ciclo por segundo o más (por ejemplo, dos ciclos por segundo o más, tres ciclos por segundo o más, cuatro ciclos por segundo o más, cinco ciclos por segundo o más, siete ciclos por segundo o más, diez ciclos por segundo o más).

Se pueden utilizar también técnicas de agitación adicionales. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la pinza de sustrato 20A y/o 20B puede incluir un actuador que haga girar el sustrato alrededor de un eje perpendicular al eje de rotación del actuador 30A y/o 30B representado en las FIG. 1 y 3.

10 Alternativamente, la plataforma 60A y/o 60B puede estar equipada con un ajustador del separador para elevar o bajar los uno o más separadores 70A-D y/o 71A-D durante las fases de fijación, tinción y aclarado. Para implementar el ajustador del separador, la plataforma 60A y/o 60B puede incluir separadores que estén unidos a una placa interna en la plataforma. La altura de la placa se puede variar utilizando un actuador interno, variando por lo tanto la altura de los separadores. Alternativamente, la posición de los separadores 70A-D y 71A-D en relación con el sustrato 2 se puede cambiar dando instrucciones al actuador para que mueva la plataforma 60A y/o 60B, o el bloque 15 80A y/o 80B, cambiando de este modo la distancia de separación durante la fase de agitación. El sistema de control 5 puede ajustar la frecuencia de los ciclos de fluido, el caudal, la altura del separador, la distancia de separación y los parámetros de agitación y la frecuencia para procesar las muestras de manera más eficiente, utilizando significativamente menos volúmenes de fluido durante el proceso de preparación de la muestra en comparación con las técnicas convencionales de tinción y preparación.

20 En algunas formas de realización, los brazos de sustrato se pueden fabricar de un material que se flexione de tal manera que, si un sustrato en la posición de procesamiento de la muestra descansa contra solo dos separadores que se extienden desde la plataforma, un actuador u otro elemento de fuerza motriz pueda hacer girar el portaobjetos más hacia la superficie de la plataforma hasta que el portaobjetos se apoye en todos los cuatro separadores. La variación de la posición del sustrato entre estas dos posiciones puede lograr una agitación 25 suficiente durante el procesamiento de la muestra. Los brazos de sustrato pueden incluir medidores de tensión para supervisar la tensión en el brazo de sustrato, y se pueden utilizar para informar al sistema de control 5 de la posición del sustrato con respecto a los separadores de la plataforma. Además, el sistema de control puede incluir información correspondiente a las imperfecciones del espesor del sustrato, que los sistemas de control pueden tener en cuenta al colocar el sustrato en la posición de procesamiento de la muestra o durante las fases de agitación.

30 Fases de secado

En determinadas formas de realización, el sistema de control 5 puede secar la muestra utilizando un secador 4 unido a la máquina 1. La FIG. 14 incluye un diagrama de flujo 1300 que presenta una serie de etapas para secar una muestra. Después de la etapa inicial 1302 en el que se verifica la finalización de la tinción y otras fases (por ejemplo, una o más fases de aclarado), en la etapa 1304 el secador 4 dirige un flujo de aire a través de la muestra. El proceso 35 de secado continúa en la etapa 1306, hasta que se recibe una señal de la unidad de control para detener el secado. Cuando se recibe la señal, el secador detiene el flujo de aire a través de la muestra y la fase de secado termina en la etapa 1308.

En general, la máquina 1 se puede controlar para variar la temperatura del aire, el caudal, la duración de la corriente de aire aplicada, y la(s) fase(s) durante el procesamiento de la muestra para el secado de la muestra 3. Por ejemplo, 40 después de finalizar una fase de tinción, el secador 4 puede dirigir un flujo de aire a aproximadamente 120 °F con un caudal de 10 litros por minuto durante un período de 7 segundos a través de la muestra. También se pueden ser utilizar otras temperaturas del aire (por ejemplo, temperatura ambiente de hasta 300 °F), caudales de aire (por ejemplo, desde un litro por minuto hasta 100 litros por minuto) y períodos de flujo de aire (por ejemplo, desde unos pocos segundos hasta varios minutos).

45 Sistemas de examen de muestras

Las máquinas de preparación de muestras y aparatos automatizados descritos en la presente memoria, incluyendo la máquina 1, por lo general se pueden utilizar con, y/o se incorporadas en, sistemas de examen de muestras más grandes, tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2009/0269799. Por ejemplo, la FIG. 15 muestra un diagrama esquemático que ilustra una posible forma de realización de un sistema de 50 examen de muestras 2000. El sistema 2000 incluye una plataforma 2100, un dispositivo receptor de luz 2200, un ordenador 2300, un aplicador 2400, un dispositivo de circulación de gas 2500, una fuente de luz 2600, un dispensador 2800, un dispositivo de descarga 2900, una etiquetadora de portaobjetos 3000 y un lector de etiquetas de portaobjetos 3100. Se puede configurar un dispositivo de dispositivo de avance 2110 para recibir uno o más portaobjetos u otros sustratos 2700. El dispositivo de dispositivo de avance 2110 se puede unir a una superficie, tal como la parte superior de la superficie 2101, de la plataforma. El dispositivo de dispositivo de avance 2110 puede 55 tomar la forma de una correa, y el sistema puede utilizar un brazo mecánico, gravedad, magnetismo, hidráulica, engranajes u otras técnicas de locomoción para mover las muestras montadas en sustrato a lo largo de la superficie 2101 de la plataforma.

La plataforma 2100 también puede incluir un alimentador 2102 y un colector 2106 para alimentar y recoger respectivamente los sustratos 2700 (por ejemplo, portaobjetos) desde o hacia una pila o estante. El alimentador 2102 se puede equipar con un mecanismo de propulsión alimentador 2103 (tales como ruedas de goma) para empujar las muestras sobre el dispositivo de avance 2110. Alternativamente, se podría utilizar un brazo mecánico para agarrar los sustratos 2700 y colocar los sustratos directamente sobre el dispositivo de avance. Se pueden utilizar mecanismos alternativos para impulsar los sustratos fuera del alimentador 2102, tales como imanes o sistemas hidráulicos. El alimentador puede incluir un sensor para determinar cuántos portaobjetos están presentes. El sensor podría medir el peso de los sustratos 2700, por ejemplo, para determinar cuántos sustratos están presentes. El colector 2106 también puede incluir un sensor para determinar cuántos sustratos están presentes. El sensor se puede configurar para informar al ordenador 2300 cuando se ha analizado un número predeterminado de muestras, y/o puede informar al ordenador de la recepción de una muestra montada en un sustrato de forma continua.

El dispositivo receptor de luz 2200 puede ser un microscopio (tal como un microscopio de campo claro), una cámara de video, una cámara fotográfica u otro dispositivo óptico que recibe luz. Las formas de realización que incluyen un microscopio de campo claro estándar también pueden incluir una etapa automatizada (por ejemplo, un impulsor de sustrato 2201) y un enfoque automatizado. En algunas formas de realización, se puede unir un microscopio a una etapa motorizada y un accesorio motorizado de enfoque. El microscopio puede tener una pieza nasal motorizada para permitir la selección de diferentes lentes de aumento bajo el control del ordenador 2300. Se puede utilizar una rueda de filtro para permitir que el ordenador 2300 seleccione automáticamente filtros de color de banda estrecha en la trayectoria de la luz. La iluminación LED se puede sustituir por los filtros, y la utilización de los LED puede reducir el tiempo de adquisición de la imagen en comparación con el tiempo requerido para la rotación de la rueda de filtro. Por ejemplo, se puede utilizar una cámara FireWire® de 1600 x 1200 píxeles (bus serie de alto rendimiento IEEE1394) para adquirir las imágenes de banda estrecha.

En algunas formas de realización, el dispositivo de recepción de luz 2200 recibe la luz reflejada desde el sustrato 2700 y almacena una o más imágenes formadas por la luz reflejada. Alternativamente, o, además, en algunas formas de realización, la emisión fluorescente de la muestra sobre el sustrato se puede detectar mediante el dispositivo receptor de luz 2200.

En determinadas formas de realización, el dispositivo de recepción de luz 2200 se configura para obtener imágenes de transmisión de muestras sobre sustratos. Por ejemplo, la fuente de emisión de luz 2600 se puede colocar debajo de la plataforma y puede dirigir la luz de manera que pase a través de la plataforma 2100 y el sustrato 2700 al dispositivo receptor de luz 2200.

El dispositivo receptor de luz 2200 y cualquiera de los otros componentes mostrados en la FIG. 15 puede interactuar con el ordenador 2300 a través de enlaces (2011-2014), que pueden proporcionar energía al componente, proporcionar instrucciones desde el ordenador 2300 al componente y/o permitir que el componente envíe información al ordenador 2300. Los enlaces 2011-2014 pueden ser enlaces cableados o enlaces inalámbricos.

El dispositivo de recepción de luz 2200 puede tener capacidad de movimiento axial X, Y y Z (en otras formas de realización, una etapa motorizada o impulsor de sustrato 2201 puede proporcionar movimiento en X, Y y Z). El dispositivo receptor de luz 2200 puede incluir actuadores de giro, inclinación y/o locomotores para permitir que el ordenador 2300 coloque el dispositivo receptor de luz 2200 en una posición apropiada. El dispositivo receptor de luz 2200 puede incluir una lente 2210 que enfoque la luz entrante.

El dispositivo receptor de luz 2200 se puede seleccionar para capturar imágenes en blanco y negro y/o de color. En algunas formas de realización, se pueden utilizar dos o más dispositivos receptores de luz para dividir el tiempo de procesamiento asociado con la captura de las imágenes. Por ejemplo, una estación de formación de imágenes de bajo aumento puede ir seguida de una estación de formación de imágenes de alto aumento. De manera similar, en algunas formas de realización, el sistema 2000, la plataforma 2100, el ordenador 2300 y/o el dispositivo receptor de luz 2200 pueden dirigir al impulsor de sustrato 2201 para mover el sustrato 2700 para garantizar la captura y el almacenamiento de una o más imágenes de todos o la mayoría de las células en el sustrato o en una parte específica del sustrato.

El ordenador 2300 puede ser un ordenador portátil, un servidor, una estación de trabajo o cualquier otro tipo de dispositivo informático. El ordenador puede incluir un procesador, una pantalla 2320, una interfaz 2310 y una memoria interna y/o una unidad de disco. El ordenador 2300 también puede incluir software almacenado en la memoria o en medios tangibles, legibles por ordenador, tales como una unidad óptica. El software puede incluir instrucciones para hacer que el ordenador opere el dispositivo receptor de luz 2200, el aplicador 2400, el dispositivo de circulación de gas 2500, la plataforma 2100, el dispositivo de avance 2110, la fuente de luz 2600, los dispensadores 2450 y/o 2800, la máquina de preparación de muestras 1 o cualquier componente dentro o conectado a uno de estos componentes. Del mismo modo, el ordenador se dispone para recibir información de cualquiera de estos componentes.

Por ejemplo, el software puede controlar la velocidad de dispersión de los sustratos desde el alimentador 2102, y el alimentador 2102 puede informar al ordenador sobre el número de sustratos presentes. Además, el ordenador 2300

también puede ser responsable de realizar el análisis de las imágenes capturadas por el dispositivo receptor de luz 2200. A través del proceso de análisis, el ordenador se puede organizar y controlar para calcular el número de un tipo específico de celda en un volumen particular de sangre, por ejemplo, para el recuento de glóbulos rojos, glóbulos blancos y otros componentes medidos y derivados del recuento sanguíneo completo, tales como el contenido de hemoglobina, la morfología de los glóbulos rojos o el diferencial del recuento de glóbulos blancos. El software de análisis de imágenes puede analizar cada campo individual y sumar los recuentos totales de glóbulos rojos y blancos. Para calcular los recuentos totales por microlitro en una muestra de sangre del paciente, el número contado en el portaobjetos se puede multiplicar por la proporción de dilución y el volumen de la submuestra. Los resultados de los recuentos, las mediciones morfológicas y las imágenes de glóbulos rojos y glóbulos blancos del portaobjetos se pueden mostrar en la pantalla 2320.

En algunas formas de realización, el ordenador 2300 se configura para mostrar datos numéricos, histogramas de población celular, diagramas de dispersión y evaluaciones directas de la morfología celular utilizando imágenes de células sanguíneas mostradas en el monitor. La capacidad de mostrar la morfología celular proporciona a los usuarios del sistema 2000 la capacidad de establecer rápidamente la presencia o ausencia de anomalías en la morfología celular que pueden justificar la preparación de un portaobjetos adicional para que un técnico experimentado u otro profesional la revise manualmente. El software también puede proporcionar al ordenador instrucciones para mostrar las imágenes 2331 recibidas del dispositivo receptor de luz o puede hacer que la pantalla 2330 muestre los resultados 2332 (quizás en una tabla o gráfico, por ejemplo) de un análisis de las imágenes. Del mismo modo, el ordenador 2300 se puede controlar para enumerar el número de células de un tipo específico en un volumen de sangre particular o para enumerar el número de células dañadas, células cancerosas o células lisadas en un volumen de sangre particular. El software permite que el ordenador realice el proceso de análisis. El ordenador puede utilizar uno o más aumentos durante el análisis.

Aunque se muestra como un componente, el ordenador 2300 puede incluir múltiples ordenadores; se puede utilizar un primer ordenador para controlar los componentes del sistema 2000, y se puede utilizar un segundo ordenador para procesar las imágenes del dispositivo receptor de luz 2200. Se pueden vincular los varios ordenadores para permitir que los ordenadores compartan información. El ordenador 2300 también se puede conectar a una red o sistema de información de laboratorio para permitir que el ordenador envíe y reciba información a otros ordenadores.

En determinadas formas de realización, el aplicador 2400 puede incluir una jeringa, una pipeta manual o accionada por motor, o una bomba controlada por motor unida a través de un tubo a una punta de pipeta. El aplicador 2400 aplica una muestra al sustrato 2700 de manera controlada. Las características, los atributos y los métodos de ejemplo para utilizar el aplicador 2400 se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º US 2009/0269799. La muestra puede incluir uno o más componentes sanguíneos, células, tejidos u otros componentes biológicos.

Una vez que la muestra se ha aplicado al sustrato 2700, la muestra aplicada se procesa utilizando la máquina 1. La máquina 1 funciona según se describe en la presente memoria para aplicar una o más colorantes, agentes de fijación y/u otras soluciones a la muestra sobre el sustrato.

En algunas formas de realización, el sistema 2000 se puede configurar para lograr una superposición mínima entre las células depositadas en el sustrato 2700 colocando filas de células sin contacto desde la punta del aplicador 2400. Aumentar la viscosidad del fluido diluido o el tipo o cantidad del diluyente puede afectar el ancho de las posiciones de asentamiento finales de los flujos de muestras del aplicador. Al seleccionar una distancia entre filas para permitir la variación típica en muestras de sangre, todas las células se pueden contar en todas las muestras.

El dispositivo de movimiento de gas 2500, que puede ser un dispositivo diferente según se muestra en la FIG. 15, o se puede incorporar a la máquina 1 según se describió anteriormente, puede incluir un ventilador y/o puede incluir otros dispositivos de movimiento de gas tales como un compresor o un fuelle, por ejemplo. El dispositivo de movimiento de gas 2500 se puede conectar directamente al ordenador 2300 o se puede conectar a través de otro componente, tal como la plataforma 2100 o el aplicador 2400. El dispositivo de movimiento de gas empuja gas (en algunos casos aire atmosférico) a través del sustrato para controlar la velocidad a la cual se secan las sustancias en el sustrato. Mover demasiado aire demasiado rápido (es decir, con una velocidad del ventilador demasiado alta) a través del sustrato puede provocar que las células de la muestra se estallen debido al secado rápido, y demasiado poco aire demasiado lento (es decir, con una velocidad del ventilador demasiado baja) a través del sustrato puede provocar que las células se sequen demasiado lentamente y parezca que se encogen.

El ordenador 2300 puede seleccionar y controlar la cantidad de aire que se mueve a través del sustrato en un período de tiempo (es decir, los pies cúbicos o centímetros cúbicos de aire por segundo) en función de la distancia a la que se encuentra el dispositivo de movimiento de gas desde el sustrato, el tipo de fluido que se analiza, el ancho de los flujos, la temperatura del gas (por ejemplo, el aire) y el espesor promedio de los flujos. El dispositivo de movimiento de gas 2500 se puede colocar de manera que el dispositivo dirija el gas de manera que el gas golpee el sustrato con un ángulo de 30°-60 ° (por ejemplo, 45°) durante un período de aproximadamente 15 a 20 segundos. En algunas formas de realización, el ordenador 2300 puede controlar los ajustes de humedad y temperatura en las proximidades del sistema para permitir que el proceso de secado se produzca sin la utilización de un dispositivo de movimiento de gas 2500.

El dispositivo de emisión de luz 2600, y los diversos componentes del mismo, se describen a modo de ejemplo en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. N.º 2009/0269799. Se pueden generar varias longitudes de onda de luz mediante el dispositivo de emisión de luz 2600 y detectarlas mediante el dispositivo receptor de luz 2200. Por ejemplo, las longitudes de onda tales como 415 nm son útiles para obtener una imagen de solo hemoglobina para evaluar la morfología de RBC y el contenido de hemoglobina. La luz emitida a 600 nm puede ser útil para proporcionar imágenes de alto contraste para las plaquetas y los núcleos. Se pueden elegir otras longitudes de onda para discriminar mejor los colores de basófilos, monocitos, linfocitos (todos los tonos de azul), eosinófilos (rojo) y neutrófilos (color neutro).

Ejemplos

La descripción se describe con más detalle mediante los siguientes ejemplos, que no están destinados a limitar el alcance de la invención expuesta en las reivindicaciones.

Ejemplo 1

La FIG. 16 es un diagrama de flujo 1400 que muestra una serie de etapas de ejemplo para procesar una muestra montada en un sustrato. Las etapas en el diagrama de flujo 1400 se pueden utilizar para preparar una muestra biológica para examen. Aunque la descripción de este proceso a veces se refiere a etapas específicas que tienen rangos específicos y/o describe etapas que ocurren en una secuencia específica, esta descripción pretende ser únicamente como un ejemplo no limitativo. Con referencia a la FIG. 16, la máquina 1 se conecta a un sistema de control 5 para controlar el funcionamiento de varios componentes de la máquina durante las etapas de procesamiento. En una etapa de inicio de la muestra, una muestra biológica 3 que incluye glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas de una parte alícuota de sangre se aplica a un sustrato 2 que consta de un portaobjetos de microscopio. Esto se puede realizar utilizando una estación diferente, tal como una o más de las estaciones descritas en la solicitud de patente de EE. UU. pendiente de publicación N.º 2008/0102006. En una etapa de colocación 1402, el sustrato 2 que contiene la muestra 3 se carga en la pinza de sustrato 20A del brazo de sustrato 10A según se muestra en la FIG. 1. El sistema de control 5 da instrucciones a la fuente de succión 222 (etapa 1404) para evacuar el aire de la pinza de sustrato 20A. La succión aplicada a través de los orificios de succión 21 y 22 (etapa 1406) adhiere el sustrato 2 a la pinza de sustrato 20A durante el procesamiento de la muestra. El sistema de control 5 da instrucciones (etapa 1408) al actuador 30A para hacer girar el sustrato 3 desde una posición abierta mostrada en la FIG. 1 a una posición de procesamiento de la muestra mostrada en la FIG. 3A. En la posición de procesamiento de la muestra, la muestra 3 mira se orienta hacia la superficie de la plataforma 60A mientras que el sustrato 2 permanece contra los separadores 70A-D mostrados en la FIG. 2. Los separadores impiden que el sustrato 2 haga contacto con la superficie de la plataforma 60A. En este proceso de ejemplo, la separación 92 entre la superficie del sustrato 2 que contiene la muestra y la superficie de la plataforma 60A es aproximadamente de 100 micras.

Durante la fase de fijación (etapa 1412, véase también la FIG. 10), una bomba aplica un agente de fijación a la muestra 3 en la etapa 1414. La bomba 200A conectada al tubo de fluido 54A mostrada en la FIG. 2 impulsa los agentes de fijación que comprenden metanol desde un depósito de agente de fijación 210 a través del tubo 54A, fuera por el orificio 44A, sobre la plataforma 60A, sobre el sustrato 2 que contiene la muestra 3, y dentro de la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2. La bomba 200A impulsa el metanol desde el orificio 44A con una caudal de 70 microlitros por segundo durante un período T1 de dos segundos, dirigiendo de este modo un total de 140 microlitros de metanol, V1, sobre el sustrato 2 que contiene la muestra 3.

A continuación, en una primera etapa de agitación 1416, el sistema de control 5 agita el sustrato dirigiendo el actuador 30A (etapa 1418) para elevar el borde próximo del sustrato 2 verticalmente una distancia de 35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra y devolver el sustrato a su posición de procesamiento de la muestra. La máquina 1 repite esta etapa de agitación cuatro veces más. La máquina 1 completa los cinco movimientos de agitación en aproximadamente diez segundos, T2, según se muestra en la FIG. 17. Después de la agitación, el sistema de control inicia una etapa de vacío o evacuación 1420. Se aplica una fuerza de vacío de cinco psi negativos durante un segundo y medio, T3, que evacúa cualquier metanol residual (etapa 1422) presente en la separación, en la plataforma, o en el sustrato a través de los orificios 40A y 41A, y los tubos de desecho 50A y 51A. El metanol evacuado se recoge en un contenedor de desechos 230 y/o 231.

Después de la fase de fijación, el sistema de control 5 inicia (etapa 1424) una primera fase de tinción. Al hacerlo, el sistema de control 5 dirige a la máquina 1 para teñir la muestra (etapa 1426). Con referencia a la FIG. 2 y el diagrama de flujo de la FIG. 11, la bomba 201 conectada al tubo de fluido 52A impulsa el tinte de fluoresceína de un depósito de colorante 211A fuera por el orificio 42A, sobre la plataforma 60A, sobre el sustrato 2 que contiene la muestra 3, y dentro de la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2. La bomba 201 dispensa el tinte de fluoresceína a través del orificio 42A con un caudal de 70 microlitros por segundo durante un período de dos segundos, T4, dirigiendo de este modo 140 microlitros de tinte, V2, sobre el sustrato.

Después de aplicar el tinte de fluoresceína a la muestra 3, la máquina 1 realiza una segunda etapa de agitación 1428 dirigiendo el actuador 30A para elevar, en la etapa 1430, el borde próximo del sustrato 2 verticalmente una distancia de 35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra y a continuación regresa el sustrato a su

posición de procesamiento de la muestra. El sistema de control 5 hace que la máquina 1 repita esta etapa de agitación dos veces más y complete las tres agitaciones durante un período de aproximadamente seis segundos, T5, según se muestra en la FIG. 17.

5 A continuación, se inicia una segunda fase de vacío o evacuación en la etapa 1432. Se aplica un vacío de cinco psi negativos durante tres segundos, T6, en la etapa 1434 para evacuar cualquier tinte de fluoresceína residual presente en la separación 92 o en la plataforma y el sustrato a través de los orificios 40A y/o 41A, y los tubos de desecho 50A y 51A. El tinte de fluoresceína evacuado se recoge en un contenedor de desechos 230A y/o 231 A.

10 Después de la tinción de la muestra con tinte de fluoresceína, la máquina 1 inicia una segunda fase de tinción en la etapa 1436 utilizando tinte de tiazina. La bomba 202 conectada al tubo de fluido 53A impulsa el tinte de tiazina desde un depósito de colorante a través del orificio 43A, sobre la plataforma 60A, sobre el sustrato 2 y dentro de la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2 (etapa 1438). La máquina 1 administra el tinte de tiazina a través del orificio 43A con un caudal de 70 microlitros por segundo durante un período de dos segundos, T7, dirigiendo de este modo un total de 140 microlitros de tinte de tiazina, V3, sobre el sustrato.

15 Después de aplicar el colorante a la muestra 3, la máquina 1 inicia una tercera fase de agitación en la etapa 1440 dirigiendo el actuador 30A para elevar el borde próximo del sustrato 2 (etapa 1442) a una distancia de 35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra y a continuación regresa el sustrato que contiene la muestra 3 a su posición de procesamiento de la muestra. La máquina 1 repite esta etapa de agitación tres veces más. La máquina completa los cuatro movimientos de agitación durante un período de aproximadamente ocho segundos, T8.

20 A continuación, se inicia una tercera etapa de vacío o evacuación 1444. Se aplica un vacío de cinco psi negativos durante dos segundos, T9, para evacuar el tinte tiazina residual en la etapa 1446 presente en la separación o en la plataforma 60A y el sustrato 2 a través de los orificios 40A y/o 41A, y los tubos de desecho 50A y/o 51A, después de la agitación. El tinte de tiazina evacuado se recoge en un contenedor de desechos 230A y/o 231A.

25 La máquina 1 realiza a continuación dos secuencias de fases de vacío-agitación-aclarado. La primera secuencia de fases se inicia en la etapa 1448 cuando el sistema de control 5 da instrucciones a la máquina 1 para que inicie una primera fase de aclarado. Un depósito 213A que contiene una solución de aclarado de agua destilada se conecta a una bomba 203 y un tubo de fluido 55A. La bomba 203 dirige el agua destilada a través del tubo de lavado 55A que se introduce dentro del orificio 45A, dentro de la separación 92, y sobre la plataforma 60A y el sustrato 2 para aclarar la muestra 3 en la etapa 1450. Alternativamente, en algunas formas de realización, el fluido de lavado se dirige a través de dos o más orificios de fluido 42A a 45A. La bomba 203 dirige el agua destilada hacia afuera de los orificios 30 45A con un caudal de 70 microlitros por segundo durante dos segundos, T10, dirigiendo de este modo un total de 140 microlitros, V4, de agua sobre el sustrato que contiene la muestra.

35 A continuación, el sistema de control 5 inicia una cuarta fase de agitación en la etapa 1452, dirigiendo de actuador 30A (etapa 1454) para elevar el borde próximo del sustrato 2 verticalmente una distancia de 35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra y regresar el sustrato a su posición de procesamiento de la muestra. El sistema de control 5 puede dirigir a la máquina 1 para que repita esta fase de agitación y complete las dos agitaciones en aproximadamente cuatro segundos, T11.

40 A continuación, se inicia una fase de vacío o evacuación en la etapa 1456. Un vacío de cinco psi aplica durante cinco segundos y medio, T12, en la etapa 1458, evacua el agua destilada residual presente en la separación 92 o en la 60A plataforma y sustrato 2 a través de los orificios 40A y/o 41A, y los tubos de desecho 50A y/o 51A después de la agitación.

45 Acto seguido, en la etapa 1460, el sistema de control 5 dirige la máquina 1 para comenzar la segunda secuencia de fases aclarado-agitación-vacío mediante el inicio de una segunda fase de aclarado. Una segunda fase de aclarado (etapas 1460, 1462), una quinta fase de agitación (etapas 1464, 1466) y una quinta fase de vacío (etapas 1468, 1470) se realizan de la misma manera que se describió anteriormente para la primera fase de aclarado-agitación-vacío. Durante la segunda fase de aclarado-agitación-vacío, la cantidad de fluido de lavado, V5 y los tiempos de procesamiento T13, T14 y T15 son generalmente los mismos que en la primera secuencia de fase de aclarado-agitación-vacío.

50 Una vez que la muestra se ha fijado, teñido con colorantes de fluoresceína y tiazina, y aclarado, la máquina 1 inicia una fase de secado en la etapa 1472. El secador 4 dirige un flujo de aire a aproximadamente 120° con un caudal de 10 litros por minuto (etapa 1474) durante un período de ocho segundos, T16, a través de la muestra.

Después de completar estas etapas, el sustrato 2 se regresa a su posición original en la etapa 1476. En esta etapa, el actuador 30A hace girar el sustrato 2 desde la posición de procesamiento de la muestra a la posición abierta según se representa en la FIG. 1. A continuación se puede retirar el sustrato 2 mediante un impulsor de sustrato, y se puede cargar un nuevo sustrato para procesar una nueva muestra.

Ejemplo 2

Las etapas del proceso descritas anteriormente para el Ejemplo 1 se pueden ajustar en otras formas de realización de la invención como sigue. Además, en las siguientes etapas de procesamiento de ejemplo se pueden utilizar las formulaciones de agente de fijación, colorante y solución de aclarado descritas en la solicitud de patente provisional de EE. UU. N ° 61/505.011.

Durante una primera fase de fijación (etapa 1412, véase también la FIG. 10), una bomba aplica una solución de agente de fijación a la muestra 3 en la etapa 1414. La bomba 200A conectada al tubo de fluido 54A mostrada en la FIG. 2 impulsa una solución de agente de fijación que comprende metanol desde un depósito de agente de fijación 210 a través del tubo 54A, fuera por el orificio 44A, sobre la plataforma 60A, sobre el sustrato 2, y dentro de la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2. La bomba 200A impulsa la solución de agente de fijación desde el orificio 44A con un caudal de 115 microlitros por segundo durante un período de dos segundos T1, dirigiendo de este modo un total de 230 microlitros de la solución de agente de fijación, V1, sobre el sustrato 2.

A continuación, en una primera etapa de agitación 1416, el sistema de control 5 agita el sustrato dirigiendo el actuador 30A (etapa 1418) para elevar el borde próximo del sustrato 2 verticalmente una distancia de 35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra y regresar la muestra a su posición de procesamiento de la muestra. La máquina 1 repite esta etapa de agitación cinco veces más. La máquina 1 completa los seis movimientos de agitación en aproximadamente 12 segundos. Después de la agitación, el sistema de control inicia una etapa de vacío 1420. Se aplica una fuerza de vacío de seis psi negativos durante un segundo y medio, T3, evacuando cualquier solución de agente de fijación residual (etapa 1422) presente en la separación, sobre la plataforma o sobre el sustrato a través de los orificios 40A y 41A, y los tubos de desecho 50A y 51A. La solución de agente de fijación evacuada se recoge en un contenedor de desechos 230 y/o 231.

Acto seguido, en una segunda fase de fijación que incluye una segunda etapa de agitación, las etapas anteriores de la primera fase de la fijación y la primera etapa de agitación se repiten.

Después de las fases de fijación, el sistema de control 5 inicia (etapa 1424) una primera fase de tinción. Al hacerlo, el sistema de control 5 dirige a la máquina 1 para teñir la muestra (etapa 1426). Con referencia a la FIG. 2 y el diagrama de flujo de la FIG. 11, la bomba 201 conectada al tubo de fluido 52A impulsa una primera solución de colorante que comprende eosina Y de un depósito de colorante 211A fuera por el orificio 42A, sobre la plataforma 60A, sobre el sustrato 2 que incluye la muestra 3, y dentro de la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2. La bomba 201 dispensa la primera solución de colorante a través del orificio 42A con un caudal de 115 microlitros por segundo durante un período de dos segundos, T4, dirigiendo de este modo 230 microlitros de la primera solución de colorante, V2, sobre el sustrato.

Después de aplicar una primera solución de colorante a la muestra 3, la máquina 1 realiza una segunda etapa de agitación 1428 dirigiendo el actuador 30A para elevar, en la etapa 1430, el borde próximo del sustrato 2 verticalmente una distancia de 35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra y a continuación regresa la muestra a su posición de procesamiento de la muestra. El sistema de control 5 hace que la máquina 1 repita esta etapa de agitación dos veces más y complete las tres agitaciones durante un período de aproximadamente seis segundos, T5, según se muestra en la FIG. 17.

A continuación, se inicia una segunda fase de vacío en la etapa 1432. Se aplica un vacío de cinco psi negativos durante tres segundos, T6, en la etapa 1434 para evacuar cualquier solución del primer colorante residual presente en la separación 92 o en la plataforma y el sustrato a través de los orificios. 40A y/o 41A, y los tubos de desecho 50A y 51A. La primera solución de colorante evacuada se recoge en un contenedor de desechos 230A y/o 231 A.

Después de teñir la muestra con la primera solución de colorante que incluye eosina Y, la máquina 1 inicia una segunda fase de tinción en la etapa 1436 utilizando una segunda solución de colorante que incluye azul celeste B y azul de metileno. La bomba 202 conectada al tubo de fluido 53A impulsa la segunda solución de colorante desde un depósito de colorante a través del orificio 43A, sobre la plataforma 60A, sobre el sustrato 2 y dentro de la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2 (etapa 1438). La máquina 1 dispensa la segunda solución de colorante a través del orificio 43A con un caudal de 115 microlitros por segundo durante un período de dos segundos, T7, dirigiendo de este modo un total de 230 microlitros de la segunda solución de colorante, V3, sobre el sustrato.

Después de aplicar el colorante a la muestra 3, la máquina 1 inicia una tercera fase de agitación en la etapa 1440 dirigiendo el actuador 30A para elevar el borde próximo del sustrato 2 (etapa 1442) a una distancia de 35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra y a continuación regresa la muestra 3 a su posición de procesamiento de la muestra. La máquina 1 repite esta etapa de agitación dos veces más. La máquina completa los tres movimientos de agitación durante un período de aproximadamente seis segundos, T8.

A continuación, se inicia una tercera etapa de vacío 1444. Se aplica un vacío de seis psi negativos durante dos segundos, T9, para evacuar la solución del segundo colorante residual en la etapa 1446 presente en la separación o sobre la plataforma 60A y el sustrato 2 a través de los orificios 40A y/o 41A, y los tubos de desecho 50A y/o 51A, después de la agitación. La segunda solución de colorante evacuada se recoge en un contenedor de desechos 230A y/o 231A.

- La máquina 1 realiza a continuación dos secuencias de fases vacío-agitación-aclarado. La primera secuencia de fases se inicia en la etapa 1448 cuando el sistema de control 5 da instrucciones a la máquina 1 para que inicie una primera fase de aclarado. Un depósito 213A que contiene una solución de aclarado se conecta a una bomba 203 y un tubo de fluido 55A. La bomba 203 dirige la solución de aclarado a través del tubo de lavado 55A que se introduce en el orificio 45A, dentro la separación 92 y sobre la plataforma 60A y el sustrato 2 para aclarar la muestra 3 en la etapa 1450. Alternativamente, en algunas formas de realización, la solución de aclarado se dirige a través de dos o más de los orificios de fluido 42A a 45A. La bomba 203 dirige la solución de aclarado hacia afuera de los orificios 45A con un caudal de 115 microlitros por segundo durante dos segundos, T10, dirigiendo de este modo un total de 230 microlitros, V4, de agua sobre el sustrato.
- 5
- A continuación, el sistema de control 5 inicia una cuarta fase de agitación en la etapa 1452, dirigiendo el actuador 30A (etapa 1454) para elevar el borde próximo del sustrato 2 verticalmente una distancia de 35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra y regresar la muestra a su posición de procesamiento de la muestra. El sistema de control 5 dirige a continuación la máquina 1 para repetir esta fase de agitación tres veces más y completar las cuatro agitaciones en aproximadamente ocho segundos, T11.
- 10
- A continuación, se inicia una fase de vacío en la etapa 1456. Un vacío de cinco psi se aplica durante cinco segundos y medio, T12, en la etapa 1458, se evacua la solución de lavado residual presente en la separación 92 o en la 60A plataforma y el sustrato 2 a través de los orificios 40A y/o 41A, y los tubos de desecho 50A y/o 51A después de la agitación.
- 15
- Acto seguido, en la etapa 1460, el sistema de control 5 dirige a la máquina 1 para que comience la segunda secuencia de fases vacío-agitación-aclarado iniciando una segunda fase de aclarado. Una segunda fase de aclarado (etapas 1460, 1462), una quinta fase de agitación que comprende seis agitaciones completadas en aproximadamente 12 segundos y una quinta fase de vacío (etapas 1468, 1470) se realizan de la misma manera que se describió anteriormente para la primera fase de vacío-agitación-aclarado. Durante la segunda fase de vacío-agitación-aclarado, la cantidad de solución de aclarado, V5 y los tiempos de procesamiento T13, T14 y T15 son generalmente los mismos que en la primera secuencia de fases de vacío-agitación-aclarado. Además, inmediatamente antes de la fase de vacío, el actuador 30A eleva el borde próximo del sustrato 2 a una distancia de 15-35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra. Este aumento de la separación entre el sustrato 2 y la plataforma 60 mejora la evacuación de cualquier fluido residual en la separación 92 durante la fase de vacío final.
- 20
- Una vez fijada la muestra, teñida con una primera solución de colorante que contiene eosina Y y una segunda solución de colorante que contiene azul celeste B y azul de metileno, y aclarada, la máquina 1 inicia una fase de secado en la etapa 1472. El secador 4 dirige un flujo de aire de aproximadamente 120° con un caudal de 10 litros por minuto (etapa 1474) durante un período de ocho segundos, T16, a través de la muestra.
- 25
- Después de completar estas etapas, el sustrato 2 se devuelve a su posición original en la etapa 1476. En esta etapa, el actuador 30A hace girar el sustrato 2 desde la posición de procesamiento de la muestra a la posición abierta según se representa en la FIG. 7. A continuación, se puede retirar el sustrato 2 mediante un impulsor de sustrato, y se puede cargar un nuevo sustrato para procesar una nueva muestra.
- 30
- Según se ilustra en los ejemplos de etapas de procesamiento de la muestra descritos anteriormente, los sistemas y métodos descritos en la presente memoria proporcionan un procesamiento de la muestra más eficiente al consumir menos reactivos en comparación con los métodos de procesamiento de muestras convencionales, incluyendo las técnicas de preparación de muestras manuales y automatizadas. Con referencia al Ejemplo 2, la máquina 1 consumió menos de un mililitro y medio de reactivos para fijar, teñir y aclarar la muestra durante las etapas de procesamiento de ejemplo (por ejemplo, 460 microlitros de solución de agente de fijación + 230 microlitros de primera solución de colorante + 230 microlitros de segunda solución de colorante + 460 microlitros de solución de aclarado = 1380 microlitros de reactivos). En algunas formas de realización, se pueden utilizar más o menos de 1380 microlitros de fluidos durante el procesamiento de la muestra. Por ejemplo, la cantidad de fluido utilizado en el procesamiento de una muestra puede ser de aproximadamente 1.150 microlitros (por ejemplo, eliminando una de las fases de aclarado) o menos de 1.000 microlitros (por ejemplo, eliminando una de las fases de fijación).
- 35
- Con respecto a la FIG. 17, para el Ejemplo 1, la máquina 1 consumió menos de un mililitro de reactivos para fijar, teñir y aclarar la muestra durante las etapas de procesamiento de ejemplo (por ejemplo, 140 microlitros de agente de fijación de metanol + 140 microlitros de tinte de fluoresceína + 140 microlitros de tinte de tiazina + 280 microlitros de solución de aclarado = 700 microlitros de reactivos). En algunas formas de realización, se pueden utilizar más o menos de 700 microlitros de fluidos durante el procesamiento de la muestra. Por ejemplo, la cantidad de fluido utilizado en el procesamiento de una muestra puede ser de aproximadamente 560 microlitros (por ejemplo, eliminando una de las fases de aclarado).
- 40
- En general, el volumen total de los fluidos consumidos puede ser de 500 microlitros o más (por ejemplo, 520 microlitros o más, 540 microlitros o más, 560 microlitros o más, 580 microlitros o más, 600 microlitros o más, a 650 microlitros o más, 700 microlitros o más, 750 microlitros o más) y/o 2 ml o menos (por ejemplo, 1,5 ml o menos, 1,4 ml o menos, 1,3 ml o menos, 1,2 ml o menos, 1,1 ml o menos, 1,0 ml o menos, 900 microlitros o menos).
- 45
- 50
- 55

- Con referencia a la FIG. 17 y en el Ejemplo 1, el proceso de preparación de la muestra se completa en poco más de un minuto (por ejemplo, 13,5 segundos transcurridos durante la fase de fijación + 11 segundos transcurridos durante la fase de tinte de fluoresceína + 12 segundos transcurridos durante la fase de tinte de tiazina + 23 segundos transcurridos durante las fases de aclarado + 8 segundos transcurridos durante la fase de secado = 67,5 segundos de tiempo total transcurrido). En determinadas formas de realización, la preparación de la muestra se puede completar en más, como en el Ejemplo 2, o en menos de 67,5 segundos. Por ejemplo, el procesamiento de la muestra se puede completar en 180 segundos o menos (por ejemplo, 150 segundos o menos, 120 segundos o menos, 90 segundos o menos, 80 segundos o menos, 70 segundos o menos, 60 segundos o menos, 50 segundos o menos, o 40 segundos o menos).
- Además, aunque el proceso de ejemplo anterior describe el tiempo de procesamiento para una única muestra, los sistemas y métodos para procesar múltiples sustratos (por ejemplo, la máquina 1 en la FIG. 1, configurada para procesar dos sustratos, y/o los sistemas configurados para procesar tres o más sustratos) son capaces de procesar más de 100 muestras por hora (por ejemplo, entre 60 muestras y 120 muestras por hora). La utilización de los sistemas y métodos descritos en la presente memoria en entornos de laboratorio puede dar como resultado una producción más rápida por muestra, mientras que el consumo de fluidos (por ejemplo, agentes de fijación, tintes y aclarados) se reduce en comparación con los sistemas automáticos convencionales y las técnicas manuales de preparación de muestras.
- La máquina 1 realiza a continuación dos secuencias de fases de vacío-agitación-aclarado. La primera secuencia de fases se inicia en la etapa 1448 cuando el sistema de control 5 da instrucciones a la máquina 1 para que inicie una primera fase de aclarado. Un depósito 213A que contiene una solución de aclarado se conecta a una bomba 203 y un tubo de fluido 55A. La bomba 203 dirige la solución de aclarado a través del tubo de lavado 55A que se introduce en el orificio 45A, en la separación 92 y sobre la plataforma 60A y el sustrato 2 para aclarar la muestra 3 en la etapa 1450. Alternativamente, en algunas formas de realización, la solución de aclarado se dirige a través de dos o más de los orificios de fluido 42A a 45A. La bomba 203 dirige la solución de aclarado hacia afuera de los orificios 45A con un caudal de 115 microlitros por segundo durante dos segundos, T10, dirigiendo de este modo un total de 230 microlitros, V4, de agua sobre el sustrato.
- A continuación, el sistema de control 5 inicia una cuarta fase de agitación en la etapa 1452, dirigiendo el actuador 30A (etapa 1454) para elevar el borde próximo del sustrato 2 verticalmente una distancia de 35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra y regresar la muestra a su posición de procesamiento de la muestra. El sistema de control 5 a continuación dirige la máquina 1 para repetir esta fase de agitación tres veces más y completar las cuatro agitaciones en aproximadamente ocho segundos, T11.
- A continuación, se inicia una fase de vacío en la etapa 1456. Un vacío de cinco psi se aplica durante cinco segundos y medio, T12, en la etapa 1458, se evacua la solución de aclarado residual presente en la separación 92 o en la 60A plataforma y el sustrato 2 a través de los orificios 40A y/o 41A, y los tubos de desecho 50A y/o 51A después de la agitación.
- Acto seguido, en la etapa 1460, el sistema de control 5 dirige a la máquina 1 para que comience la segunda secuencia de fases de vacío-agitación-aclarado iniciando una segunda fase de aclarado. Una segunda fase de aclarado (etapas 1460, 1462), una quinta fase de agitación que comprende seis agitaciones completadas en aproximadamente 12 segundos y una quinta fase de vacío (etapas 1468, 1470) se realizan de la misma manera que se describió anteriormente para la primera fase de vacío-agitación-aclarado. Durante la segunda fase de vacío-agitación-aclarado, la cantidad de solución de aclarado, V5 y los tiempos de procesamiento T13, T14 y T15 son generalmente los mismos que en la primera secuencia de fases de vacío-agitación-aclarado. Además, inmediatamente antes de la fase de vacío, el actuador 30A eleva el borde próximo del sustrato 2 una distancia de 15-35 micras desde la posición de procesamiento de la muestra. Este aumento de la separación entre el sustrato 2 y la plataforma 60 mejora la evacuación de cualquier fluido residual en la separación 92 durante la fase de vacío final.
- Una vez fijada la muestra, teñida con una primera solución de colorante que contiene eosina Y y una segunda solución de colorante que contiene azul celeste B y azul de metileno, y aclarada, la máquina 1 inicia una fase de secado en la etapa 1472. El secador 4 dirige un flujo de aire a aproximadamente 120° con un caudal de 10 litros por minuto (etapa 1474) durante un período de ocho segundos, T16, a través de la muestra.
- Después de completar estas etapas, el sustrato 2 se regresa a su posición original en la etapa 1476. En esta etapa, el actuador 30A hace girar el sustrato 2 desde la posición de procesamiento de la muestra a la posición abierta según se muestra en la FIG. 7. El sustrato 2 se puede retirar a continuación mediante un impulsor de sustrato, y se puede cargar un nuevo sustrato para procesar una nueva muestra.
- Como se ilustra en las etapas de procesamiento de la muestra de ejemplo descritas anteriormente, los sistemas y métodos descritos en la presente memoria proporcionan un procesamiento de la muestra más eficiente al consumir menos reactivos en comparación con los métodos de procesamiento de muestras convencionales, incluyendo las técnicas de preparación de muestras manuales y automatizadas. Con referencia al Ejemplo 2, la máquina 1 consumió menos de un mililitro y medio de reactivos para fijar, teñir y aclarar la muestra durante las etapas de procesamiento de ejemplo (por ejemplo, 460 microlitros de solución de agente de fijación + 230 microlitros de

5 primera solución de colorante + 230 microlitros de segunda solución de colorante + 460 microlitros de solución de aclarado = 1380 microlitros de reactivos). En algunas formas de realización, se pueden utilizar más o menos de 1380 microlitros de fluidos durante el procesamiento de la muestra. Por ejemplo, la cantidad de fluido utilizado en el procesamiento de una muestra puede ser de aproximadamente 1.150 microlitros (por ejemplo, eliminando una de las fases de aclarado) o menos de 1.000 microlitros (por ejemplo, eliminando una de las fases de fijación).

10 Con respecto a la FIG. 17, para el Ejemplo 1, la máquina 1 consumió menos de un mililitro de reactivos para fijar, teñir y aclarar la muestra durante las etapas de procesamiento de ejemplo (por ejemplo, 140 microlitros de agente de fijación de metanol + 140 microlitros de tinte de fluoresceína + 140 microlitros de tinte de tiazina + 280 microlitros de solución de aclarado = 700 microlitros de reactivos). En algunas formas de realización, se pueden utilizar más o menos de 700 microlitros de fluidos durante el procesamiento de la muestra. Por ejemplo, la cantidad de fluido utilizado en el procesamiento de una muestra puede ser de aproximadamente 560 microlitros (por ejemplo, eliminando una de las fases de aclarado).

15 En general, el volumen total de los fluidos consumidos puede ser de 500 microlitros o más (por ejemplo, 520 microlitros o más, 540 microlitros o más, 560 microlitros o más, 580 microlitros o más, 600 microlitros o más, a 650 microlitros o más, 700 microlitros o más, 750 microlitros o más) y/o 2 ml o menos (por ejemplo, 1,5 ml o menos, 1,4 ml o menos, 1,3 ml o menos, 1,2 ml o menos, 1,1 ml o menos, 1,0 ml o menos, 900 microlitros o menos).

20 Con referencia a la FIG. 17 y el Ejemplo 1, el proceso de preparación de la muestra se completa en poco más de un minuto (por ejemplo, 13,5 segundos transcurridos durante la fase de fijación + 11 segundos transcurridos durante la fase de tinte de fluoresceína + 12 segundos transcurridos durante la fase de tinte de tiazina + 23 segundos transcurridos durante las fases de aclarado + 8 segundos transcurridos durante la fase de secado = 67.5 segundos de tiempo total transcurrido). En determinadas formas de realización, la preparación de la muestra se puede completar en más, como en el Ejemplo 2, o en menos de 67,5 segundos. Por ejemplo, el procesamiento de la muestra se puede completar en 180 segundos o menos (por ejemplo, 150 segundos o menos, 120 segundos o menos, 90 segundos o menos, 80 segundos o menos, 70 segundos o menos, 60 segundos o menos, 50 segundos o menos, o 40 segundos o menos).

30 Además, aunque el proceso de ejemplo anterior describe el tiempo de procesamiento para una única muestra, los sistemas y métodos para procesar múltiples sustratos (por ejemplo, la máquina 1 en la FIG. 1, configurada para procesar dos sustratos, y/o los sistemas configurados para procesar tres o más sustratos) son capaces de procesar más de 100 muestras por hora (por ejemplo, entre 60 muestras y 120 muestras por hora). La utilización de los sistemas y métodos descritos en la presente memoria en entornos de laboratorio pueden dar como resultado una producción más rápida por muestra, mientras que el consumo de fluidos (por ejemplo, agentes de fijación, colorantes y fluidos de aclarado) se reduce en comparación con los sistemas automáticos convencionales y las técnicas manuales de preparación de muestras.

Otras formas de realización

35 Se debe entender que aunque la invención se ha descrito conjuntamente con la descripción detallada, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la descripción, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para preparar una muestra biológica sobre un sustrato para examen, que comprende:
 un brazo de sustrato (10A) que incluye una pinza de sustrato (20A);
 un actuador (30A, 30B) conectado al brazo de sustrato y configurado para mover el brazo de sustrato entre una posición abierta y una posición de procesamiento de la muestra;
 un actuador (30A, 30B) dispuesto y configurado para agitar un sustrato (2) agarrado por la pinza de sustrato en el brazo de sustrato;
 una plataforma (60A, 60B) que tiene una superficie superior situada opuesta al sustrato cuando el brazo de sustrato está en la posición de procesamiento de la muestra;
 estando caracterizado el aparato porque comprende, además: dos o más estructuras (70A, 70B) dispuestas en la superficie superior de la plataforma para proporcionar separación entre la superficie superior de la plataforma y el sustrato de tal manera que cuando el sustrato contacta con todas las estructuras en la posición de procesamiento del sustrato, el sustrato y la superficie superior de la plataforma son, en esencia, paralelos y forman una separación de al menos aproximadamente 50 micras;
- 15 un primer orificio de tinción (42A) situado en la superficie superior de la plataforma, un primer depósito de colorante (211A) y un primer conducto de tinción conectado al primer orificio de tinción para proporcionar una vía de fluido para bombear el colorante desde el primer depósito de colorante al primer orificio de tinción y dentro de la separación; y opcionalmente uno o más de los siguientes orificios:
 - a) un segundo orificio de tinción (43A, 43B), además del primer orificio de tinción, situado en la superficie superior de la plataforma en una ubicación diferente de la ubicación del primer orificio de tinción, un segundo depósito de colorante (212A) y un segundo conducto de tinción, en donde tanto el primero como el segundo orificios de tinción están dispuestos en la superficie superior separados de un área de la muestra en el sustrato cuando el sustrato está en la posición de procesamiento de la muestra, y en donde el segundo conducto de tinción se conecta al segundo orificio de tinción para proporcionar una vía de fluido para bombear el colorante desde el segundo depósito de colorante al segundo orificio de tinción y dentro de la separación;
 - b) un primer orificio de agente de fijación, además del primer orificio de tinción, situado en la superficie superior de la plataforma, un depósito de agente de fijación (21 OA) y un conducto de agente de fijación conectado al primer orificio de agente de fijación para proporcionar una vía de fluido para bombear el agente de fijación desde el depósito de agente de fijación hasta el primer orificio de agente de fijación y dentro de la separación;
 - c) un primer orificio de aclarado, además del primer orificio de agente de fijación, situado en la superficie superior de la plataforma, un depósito de solución de aclarado (213A) y un tubo de aclarado conectado al primer orificio de aclarado para proporcionar una vía de fluido para bombear el fluido de aclarado desde el depósito de solución de aclarado al primer orificio de aclarado y dentro de la separación;
 - d) un primer orificio de vacío (40A) situado en la superficie superior de la plataforma, un primer contenedor de desechos y un primer conducto de desechos conectado al primer orificio de vacío para proporcionar una vía de presión negativa para evacuar el fluido de la separación o el sustrato y depositar el fluido dentro del primer contenedor de desechos; y
 - e) un segundo orificio de vacío (41A), además del primer orificio de vacío, situado en la superficie superior de la plataforma y un segundo conducto de desechos conectado al segundo orificio de vacío para proporcionar una vía de presión negativa para evacuar el fluido de la separación o sustrato y depositar el fluido dentro del primer contenedor de desechos.
2. El aparato de la reivindicación 1, en donde el actuador configurado para mover el brazo de sustrato entre la posición abierta y la posición de procesamiento de la muestra y el actuador configurado para agitar un sustrato agarrado mediante la pinza de sustrato en el brazo de sustrato son el mismo actuador.
3. El aparato de la reivindicación 1, en donde un área superficial total de la superficie superior de la plataforma es más pequeña que un área superficial total del sustrato.
4. El aparato de la reivindicación 1, en donde hay al menos tres estructuras dispuestas en los bordes externos de la superficie superior de la plataforma y en el que las puntas de las estructuras definen un plano.
5. El aparato de la reivindicación 1, que comprende además un segundo orificio de tinción (43A) situado en la superficie superior de la plataforma en una ubicación diferente de la primera ubicación del orificio de tinción, un segundo depósito de colorante (212A) y un segundo conducto de tinción, en donde tanto el primer como el segundo orificios de tinción están dispuestos en la superficie superior separados de un área de muestra sobre el sustrato cuando el sustrato está en la posición de procesamiento de la muestra, y en donde el segundo conducto de tinción

se conecta al segundo orificio de tinción para proporcionar una vía de fluido para bombear el colorante desde el segundo depósito de colorante al segundo orificio de tinción y dentro de la separación.

5 6. El aparato de la reivindicación 1, en donde el al menos un orificio comprende un primer orificio de agente de fijación conectado a un depósito de agente de fijación (21OA) a través de un conducto de agente de fijación para proporcionar una vía de fluido para bombear el agente de fijación desde el depósito de agente de fijación al primer orificio de agente de fijación y dentro de la separación.

10 7. El aparato de la reivindicación 1, en donde el al menos un orificio comprende un primer orificio de vacío (40A) conectado a un primer contenedor de desechos a través de un primer conducto de desechos para proporcionar una vía de presión negativa para evacuar el fluido de la separación o el sustrato y depositar el fluido dentro del primer contenedor de desechos.

8. El aparato de la reivindicación 7, que comprende además un segundo orificio de vacío (41A) situado en la superficie superior de la plataforma y un segundo conducto de desechos conectado al segundo orificio de vacío para proporcionar una vía de presión negativa para evacuar el fluido de la separación o el sustrato y depositar el fluido dentro del primer contenedor de desechos.

15 9. Aparato según la reivindicación 8, en donde los orificios de vacío primero y segundo están situados en extremos opuestos de la superficie superior de la plataforma.

10. El aparato de la reivindicación 1, que comprende además un elemento de rótula (25A) conectado a la pinza de sustrato y que se extiende dentro de un zócalo formado por elementos de zócalo superior (25D) e inferior (25C), en donde el elemento de rótula permite el ajuste de la pinza de sustrato con respecto a la plataforma.

20 11. El aparato de la reivindicación 10, que comprende además un elemento de desviación (25B) conectado a la pinza de sustrato, y configurado para aplicar una fuerza para mantener la pinza de sustrato semifijada al brazo de sustrato.

12. El aparato de la reivindicación 1, en donde el brazo de sustrato es un primer brazo de sustrato (10A) y la pinza de sustrato es una primera pinza de sustrato (20A), y que comprende, además:

25 un segundo brazo de sustrato (10B) que incluye una segunda pinza de sustrato (20B); y

un aparato de indexación (50A) configurado para trasladar el aparato entre al menos dos posiciones, de manera que la primera y la segunda pinzas de sustrato puedan recibir cada una un sustrato de un impulsor de sustrato.

30 13. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un sistema de control (5) configurado para realizar varias etapas de agitación iniciadas mediante el actuador configurado para mover el brazo de sustrato entre la posición abierta y la posición de procesamiento de la muestra y mediante el actuador configurado para agitar un sustrato agarrado mediante la pinza de sustrato en el brazo de sustrato, en donde las etapas de agitación comprenden ciclos de movimiento hacia arriba seguidos de un movimiento hacia abajo.

14. El aparato de la reivindicación 12, en donde el aparato se traslada entre las al menos dos posiciones de manera que los sustratos se proporcionan desde el impulsor de sustrato de una manera alternativa.

35

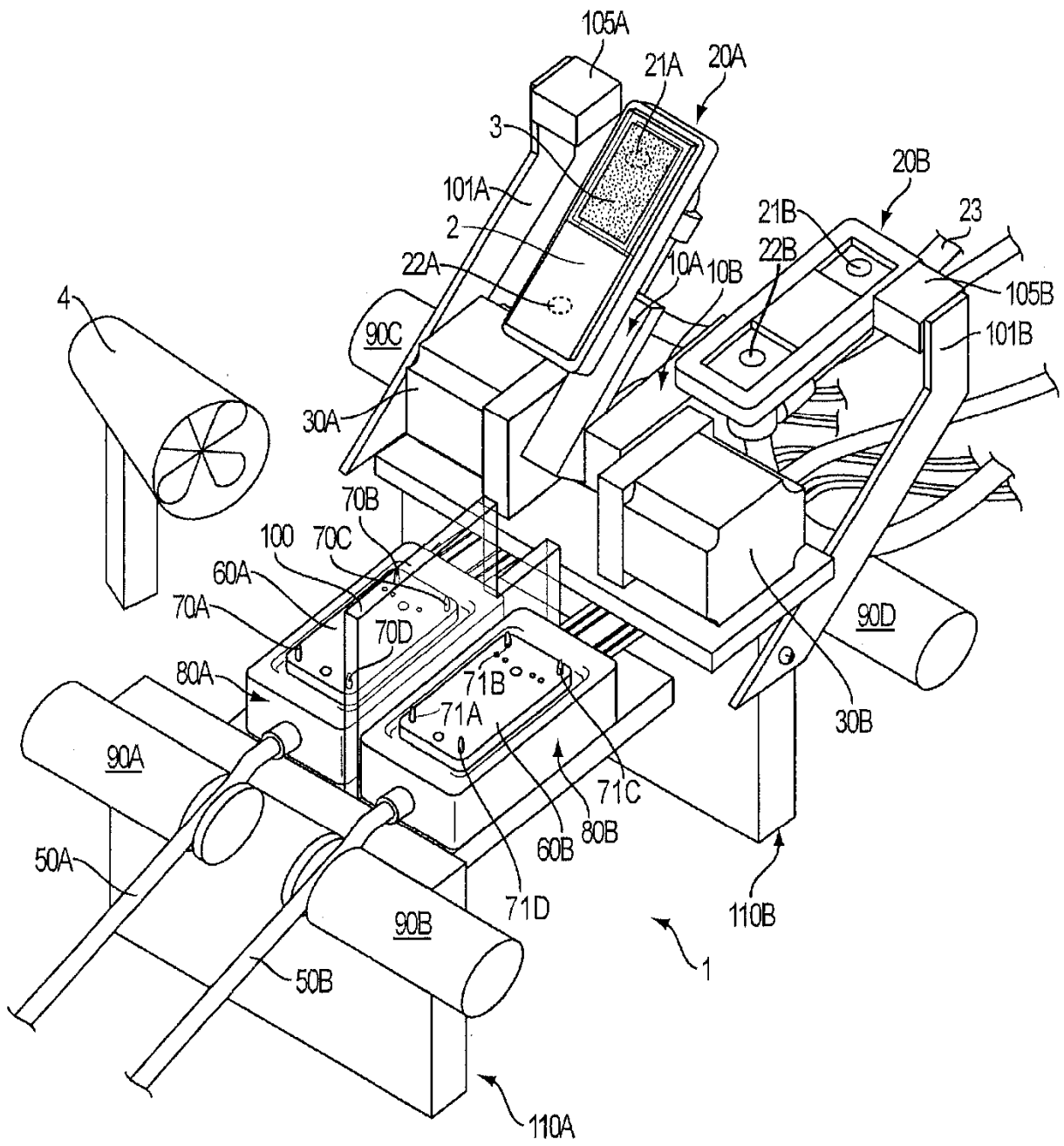


FIG. 1

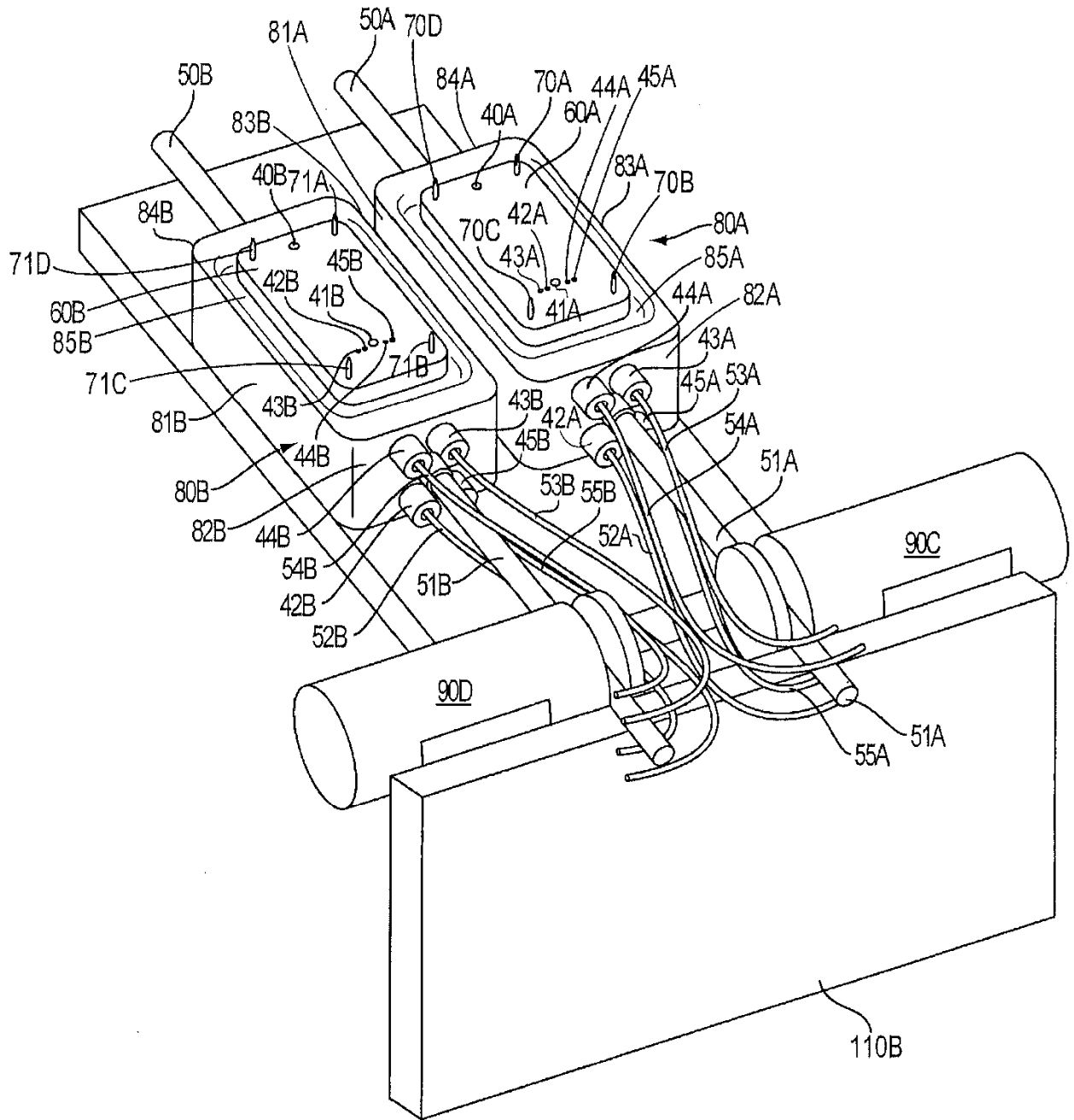


FIG. 2

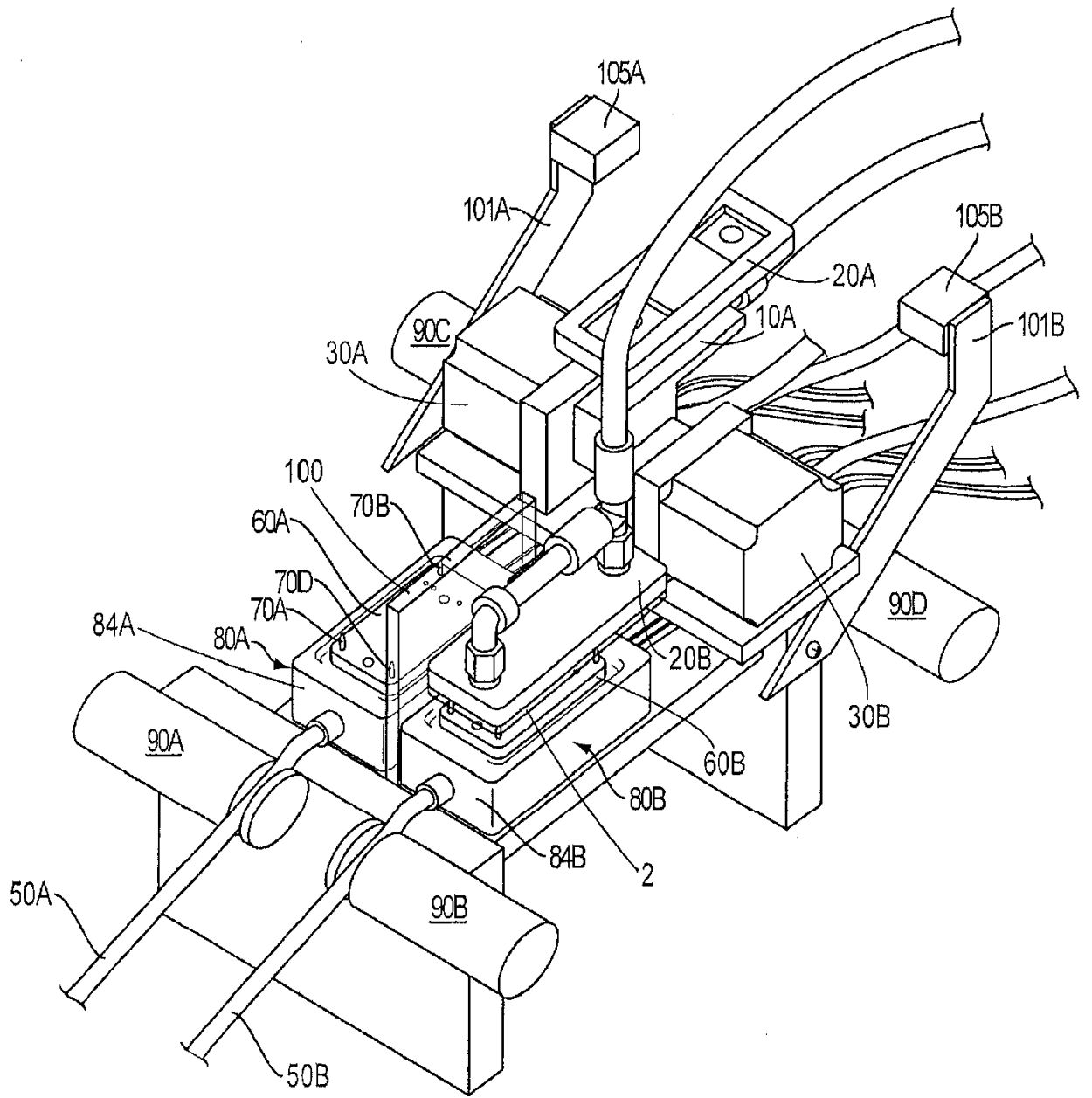


FIG. 3A

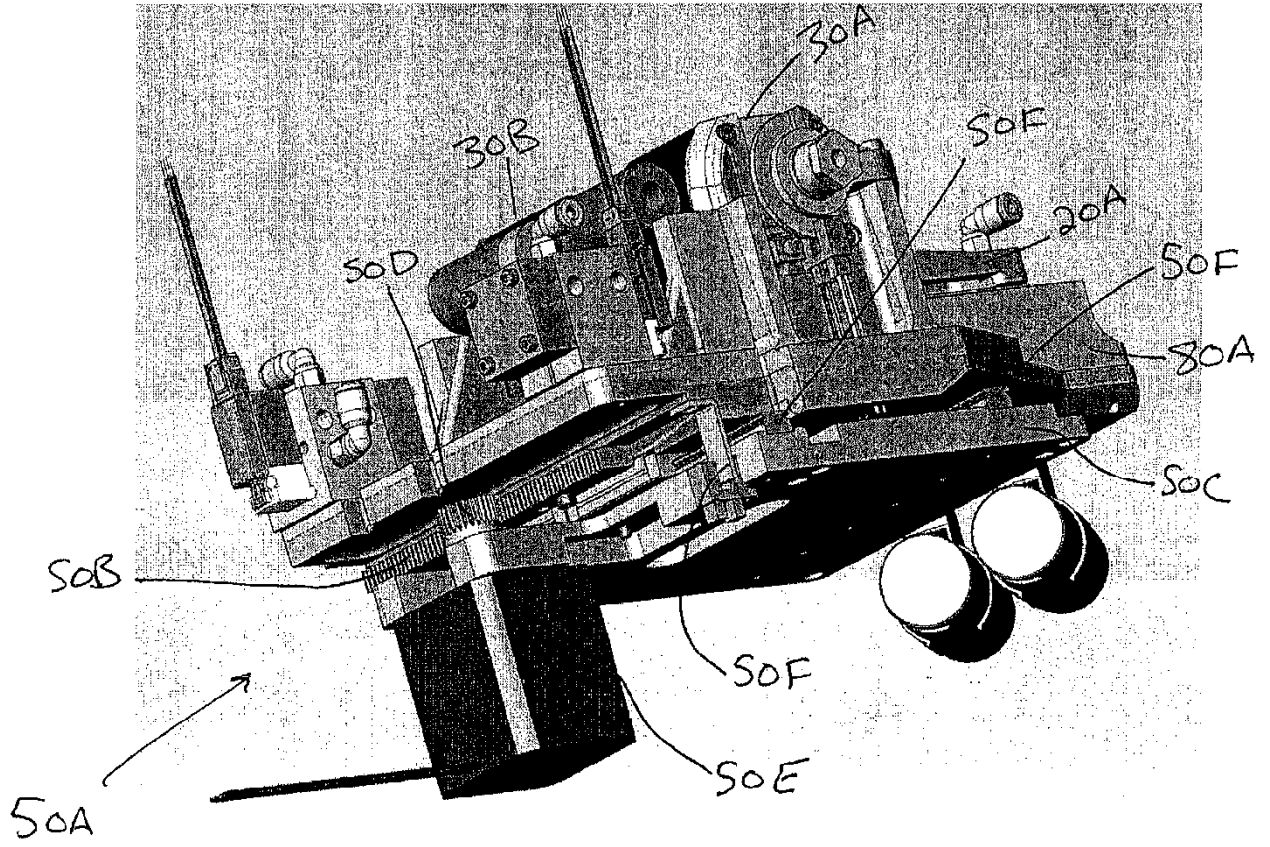


FIG. 3B

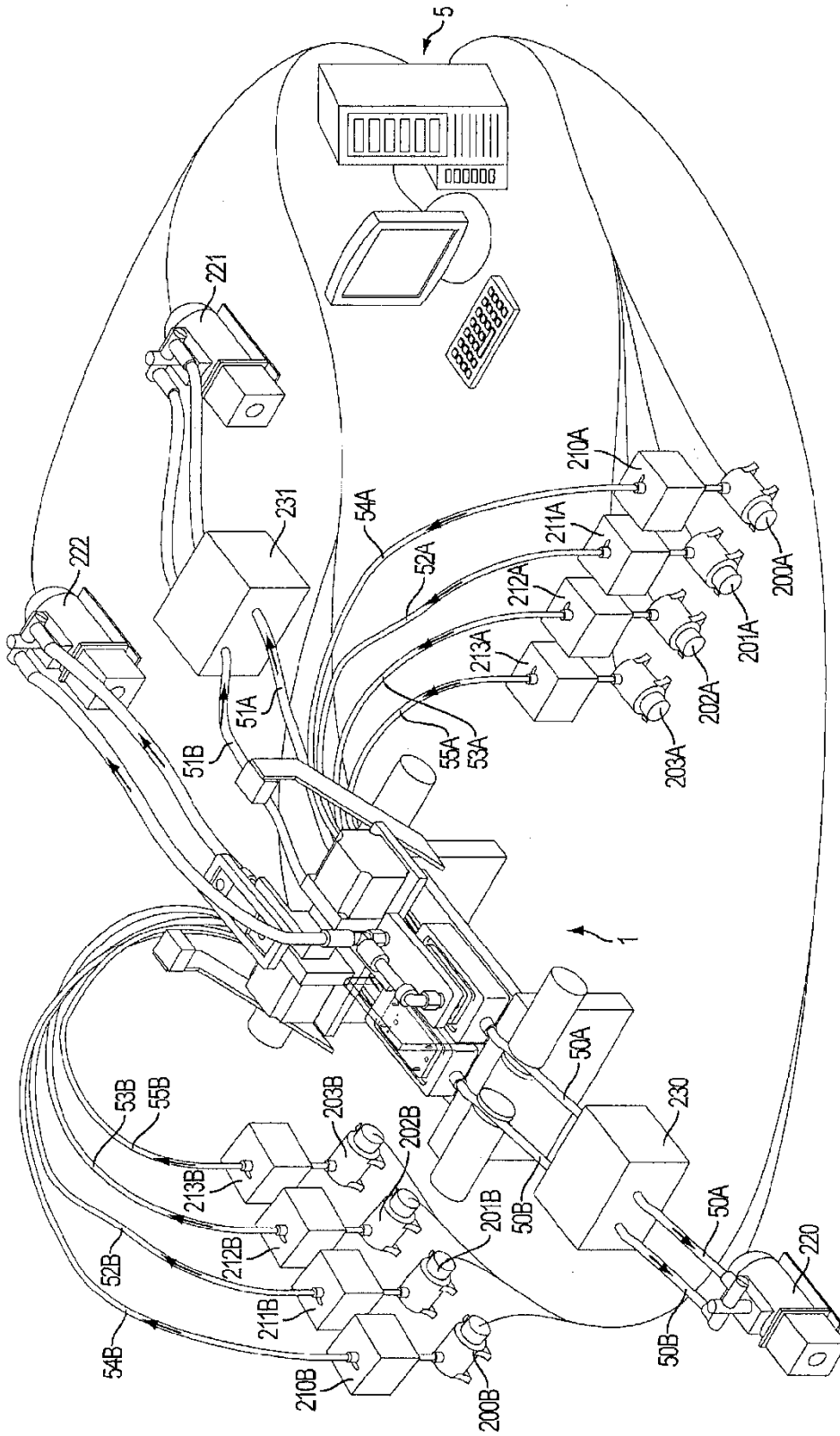


FIG. 4

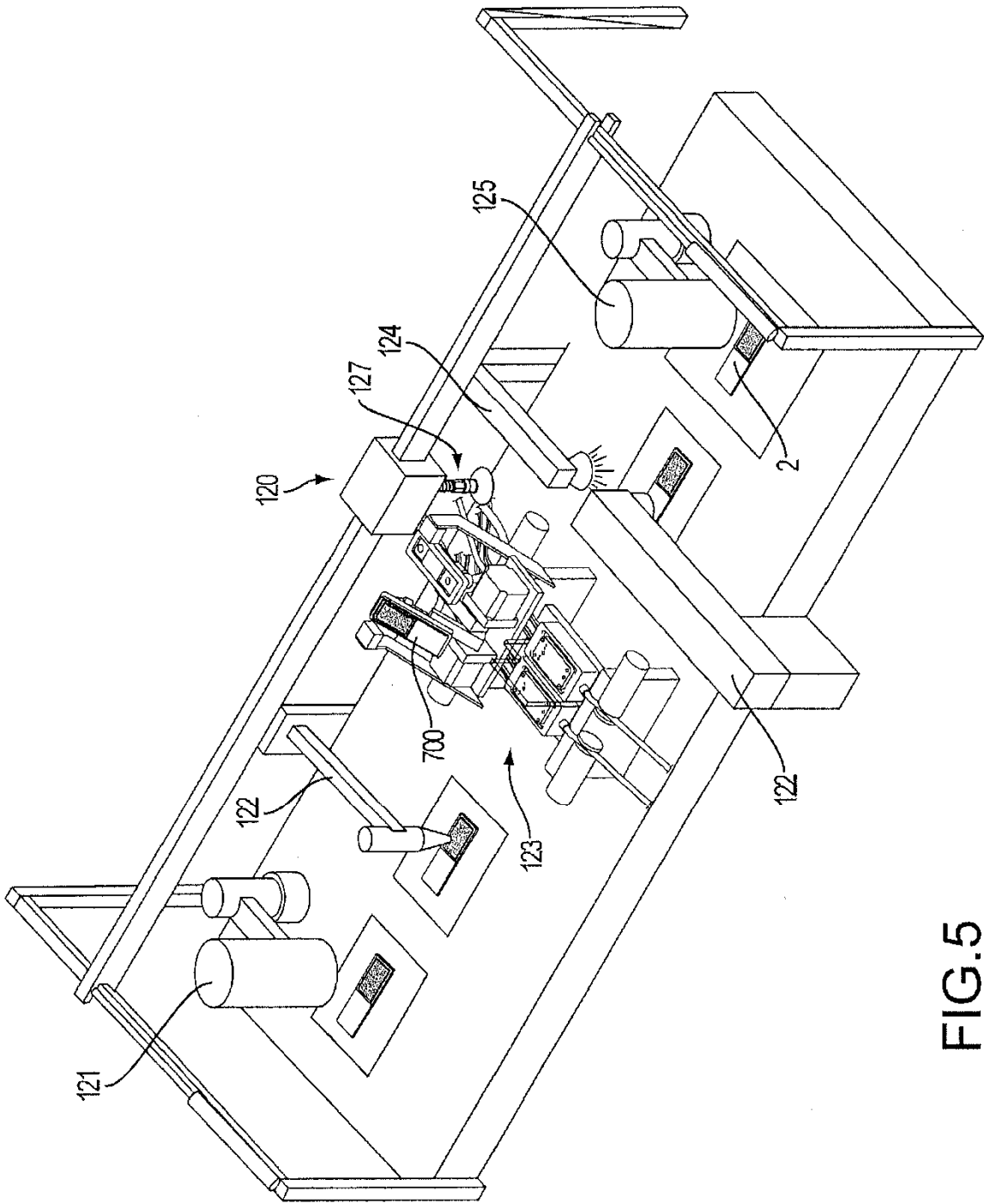


FIG.5

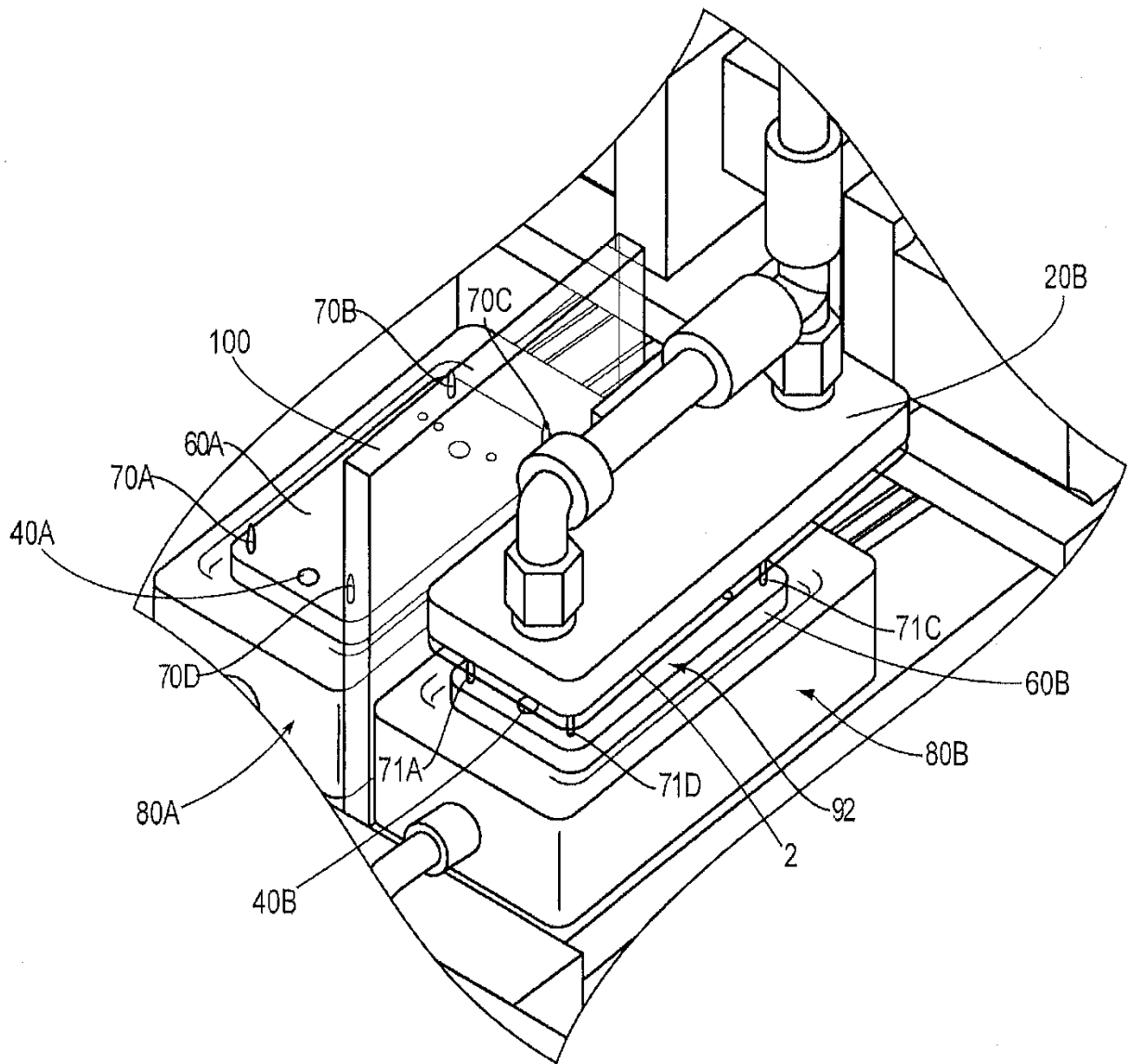


FIG. 6A

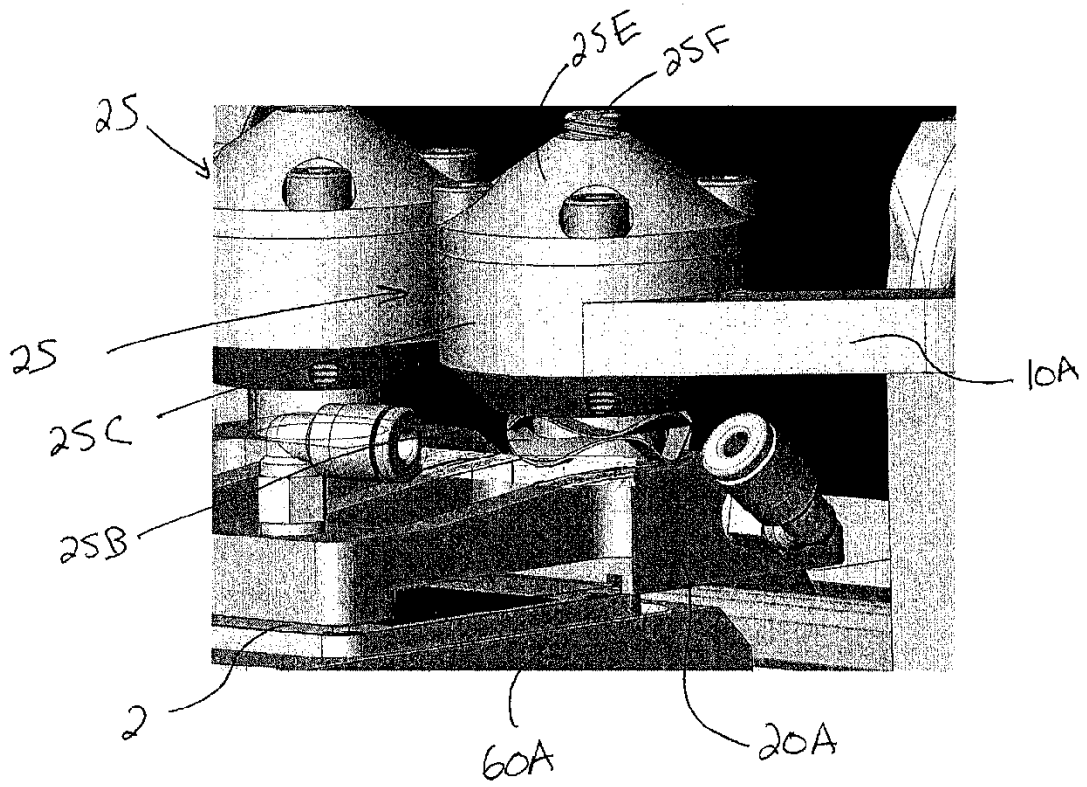


FIG. 6B

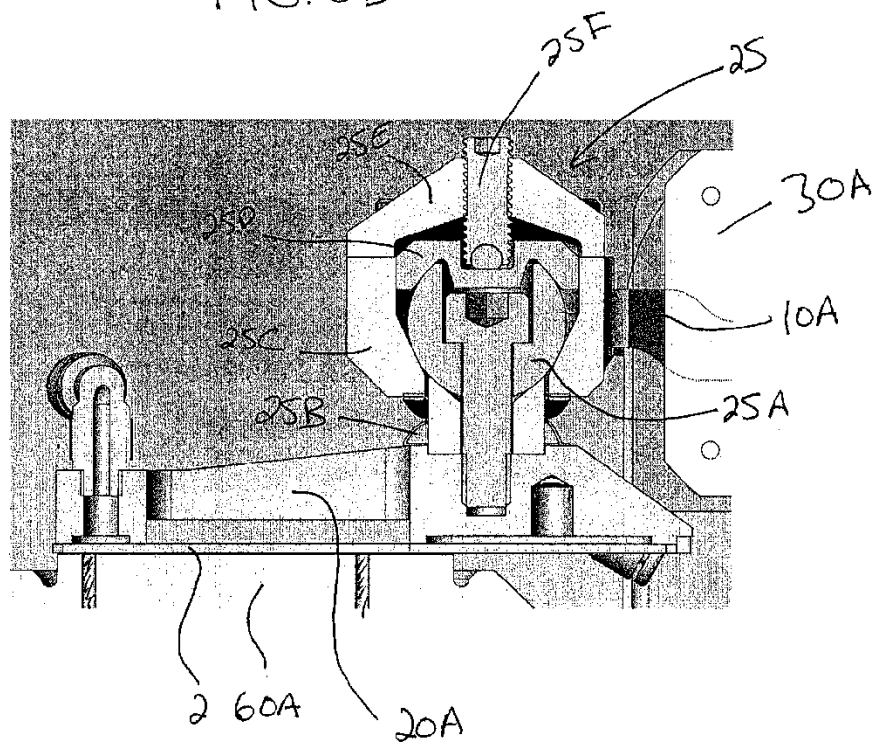


FIG. 6C



FIG. 7A

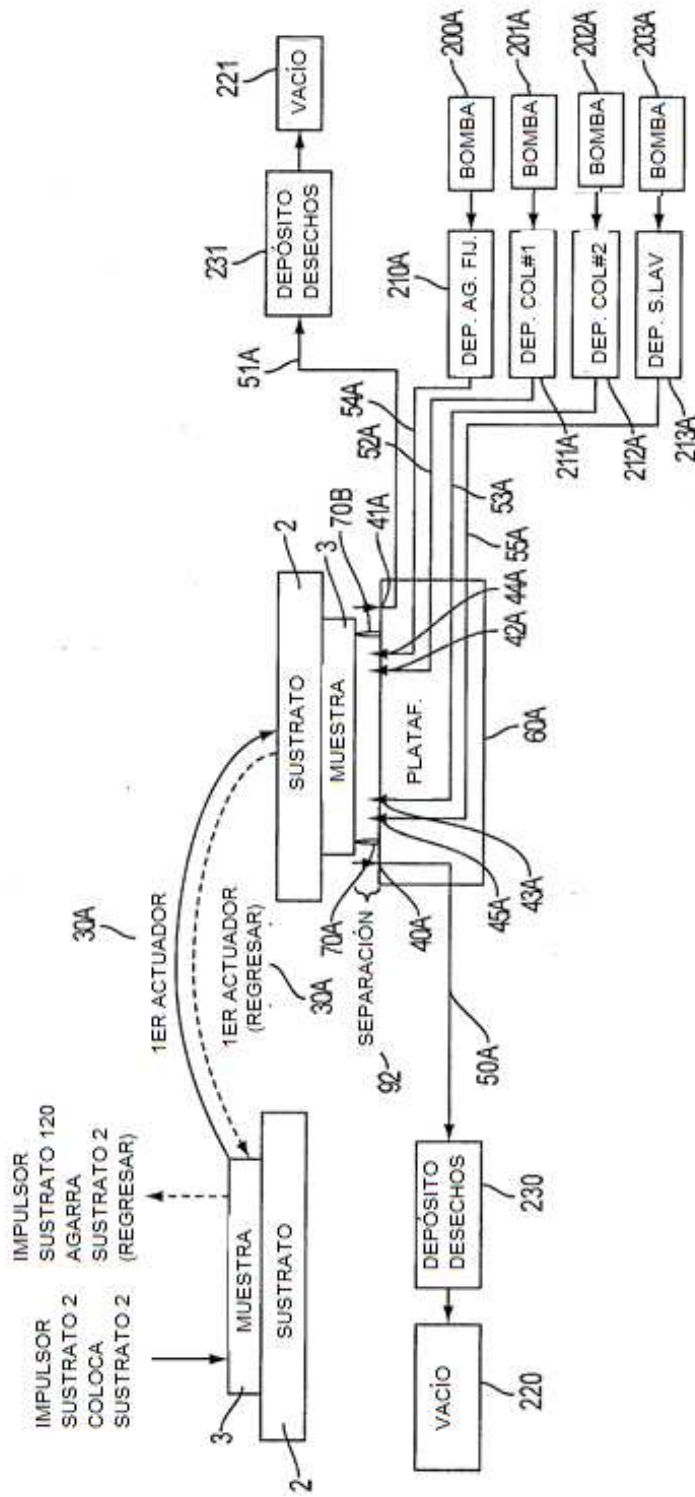


FIG. 7B

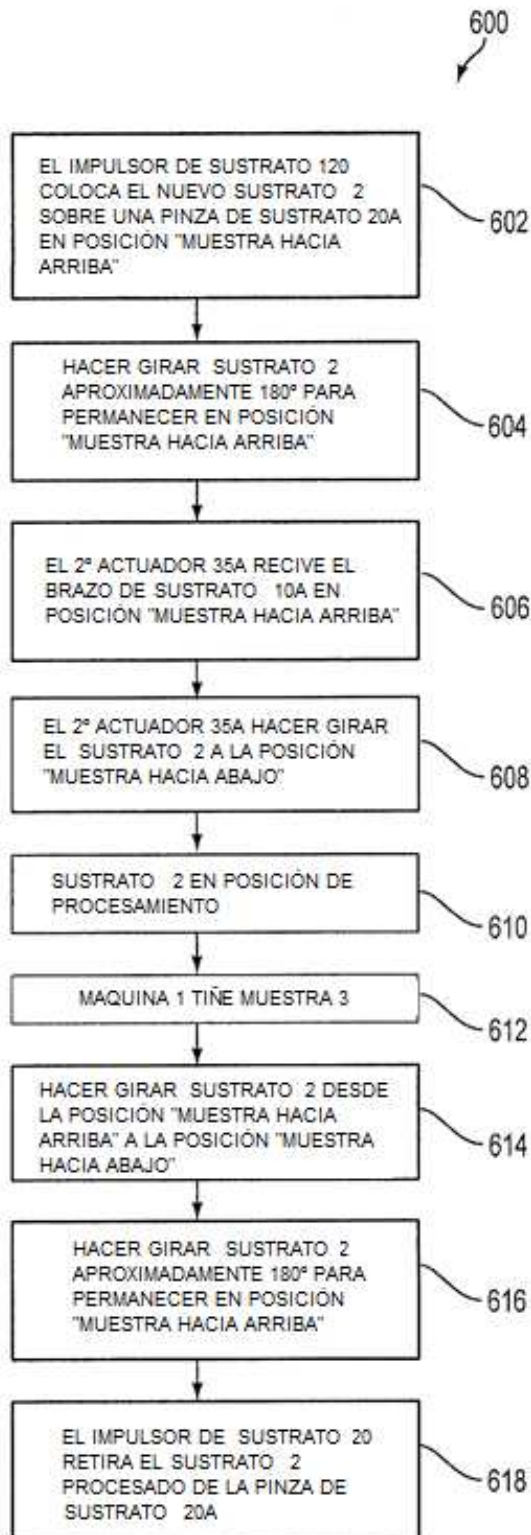


FIG. 8A

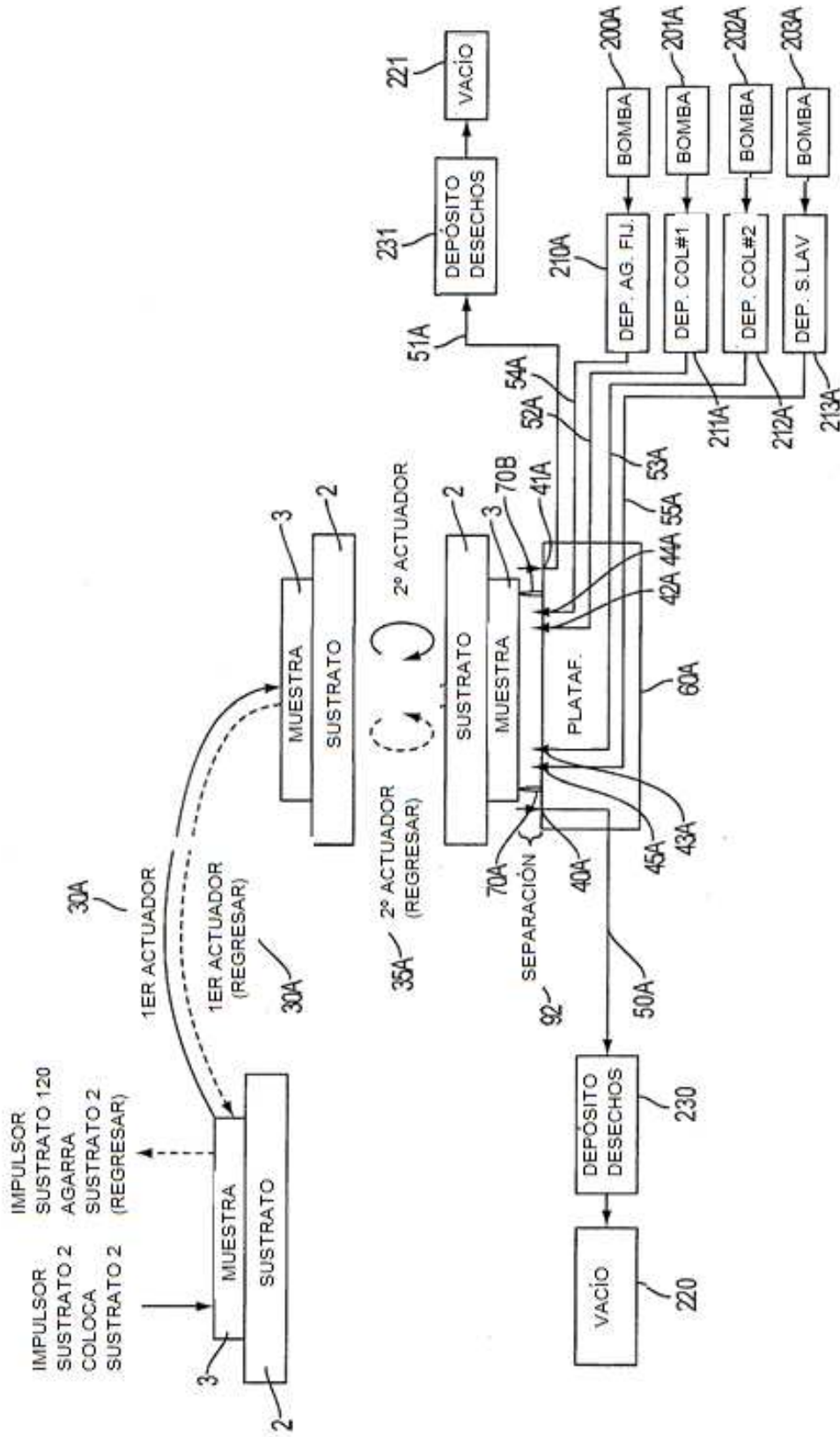


FIG. 8B

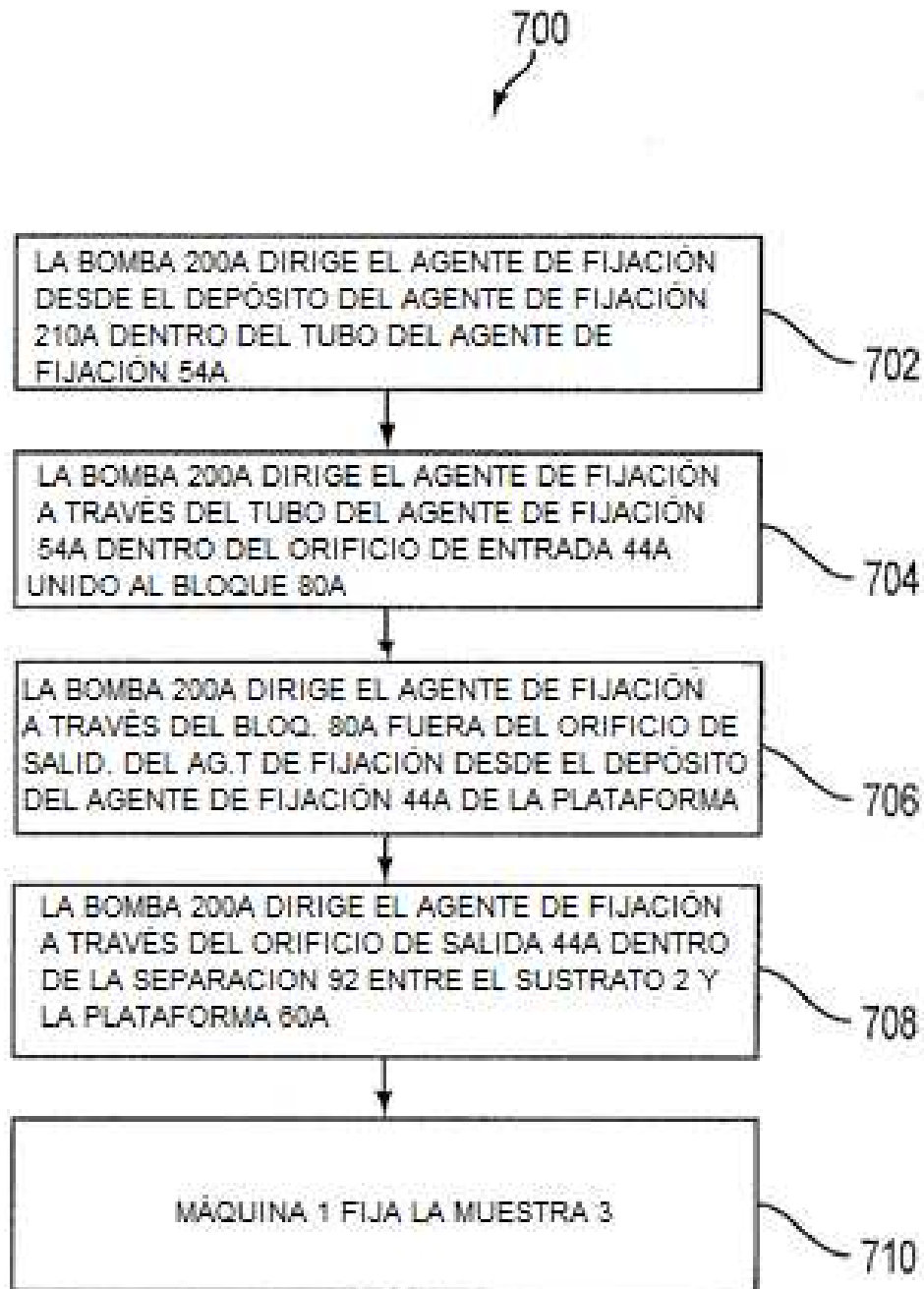


FIG. 9

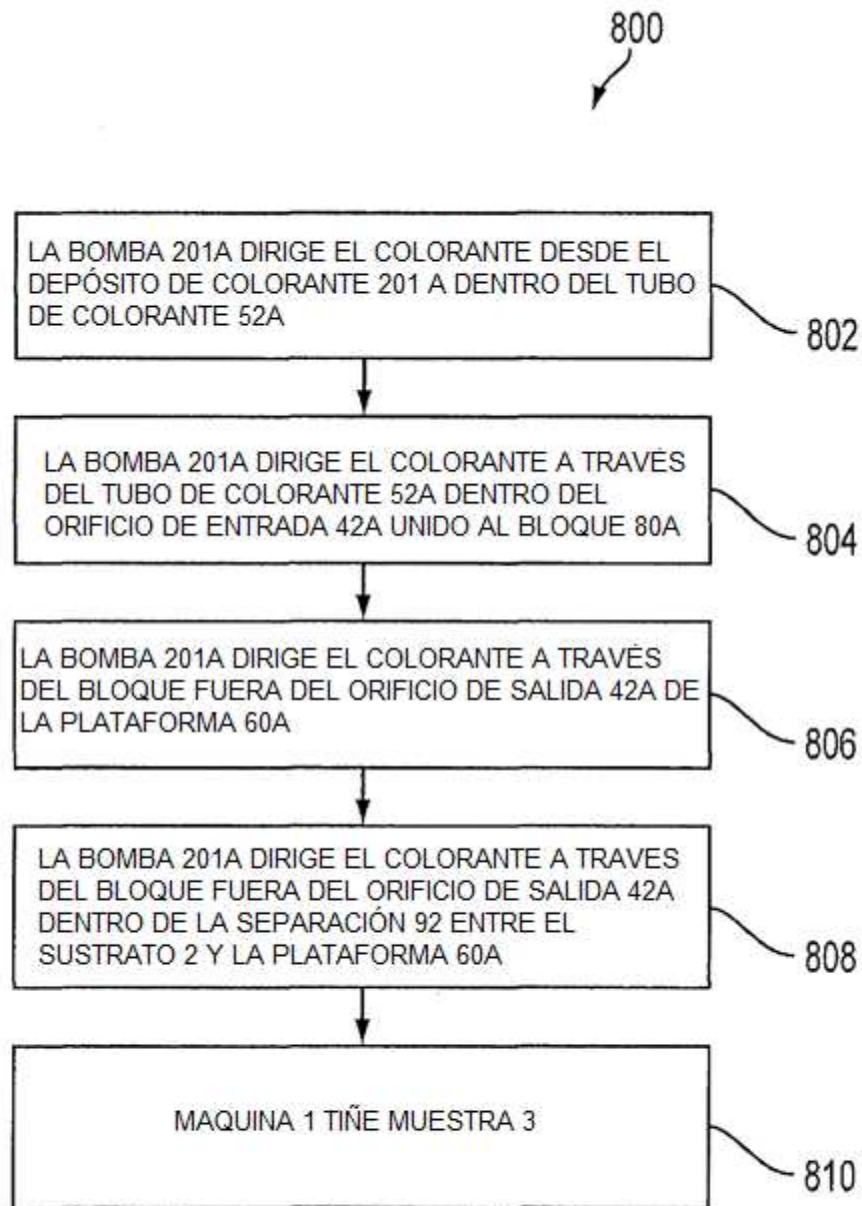


FIG. 10

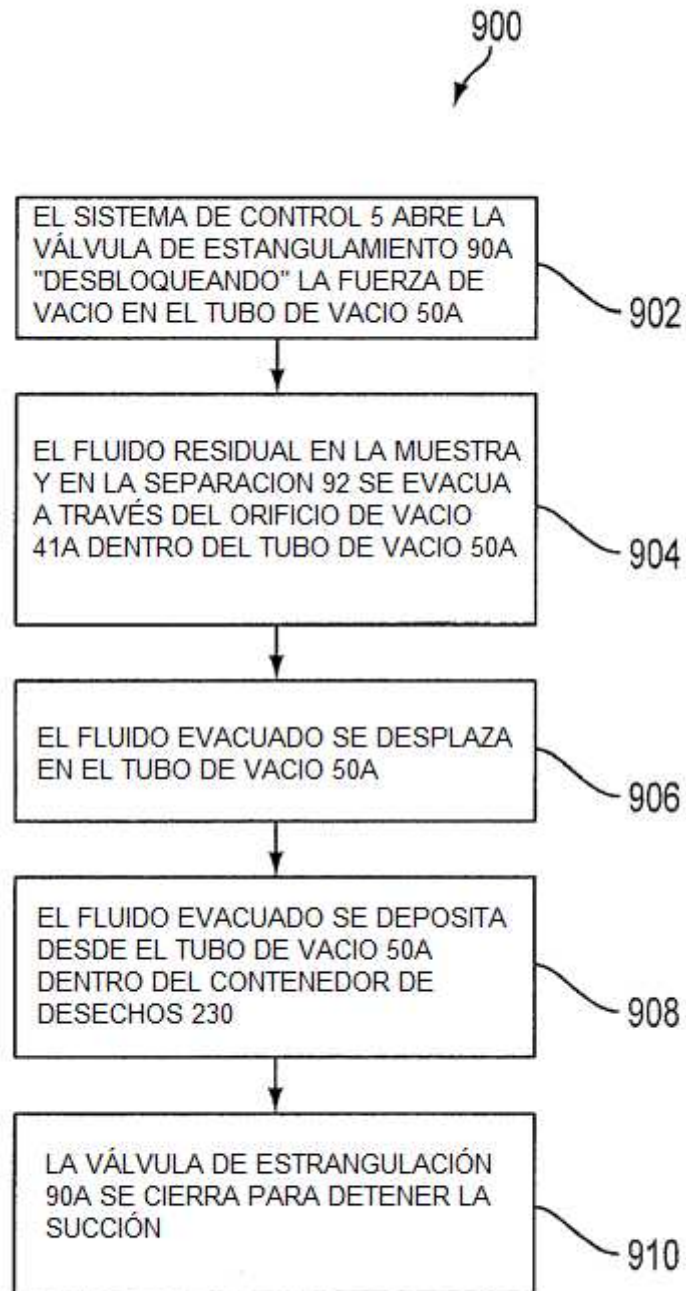


FIG. 11A

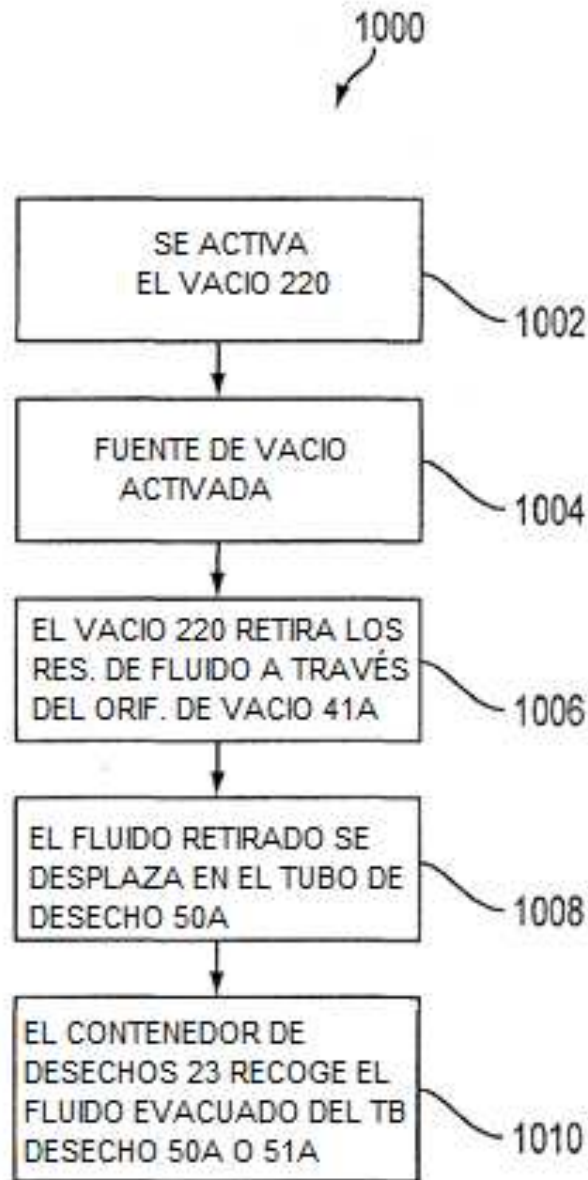


FIG. 11B

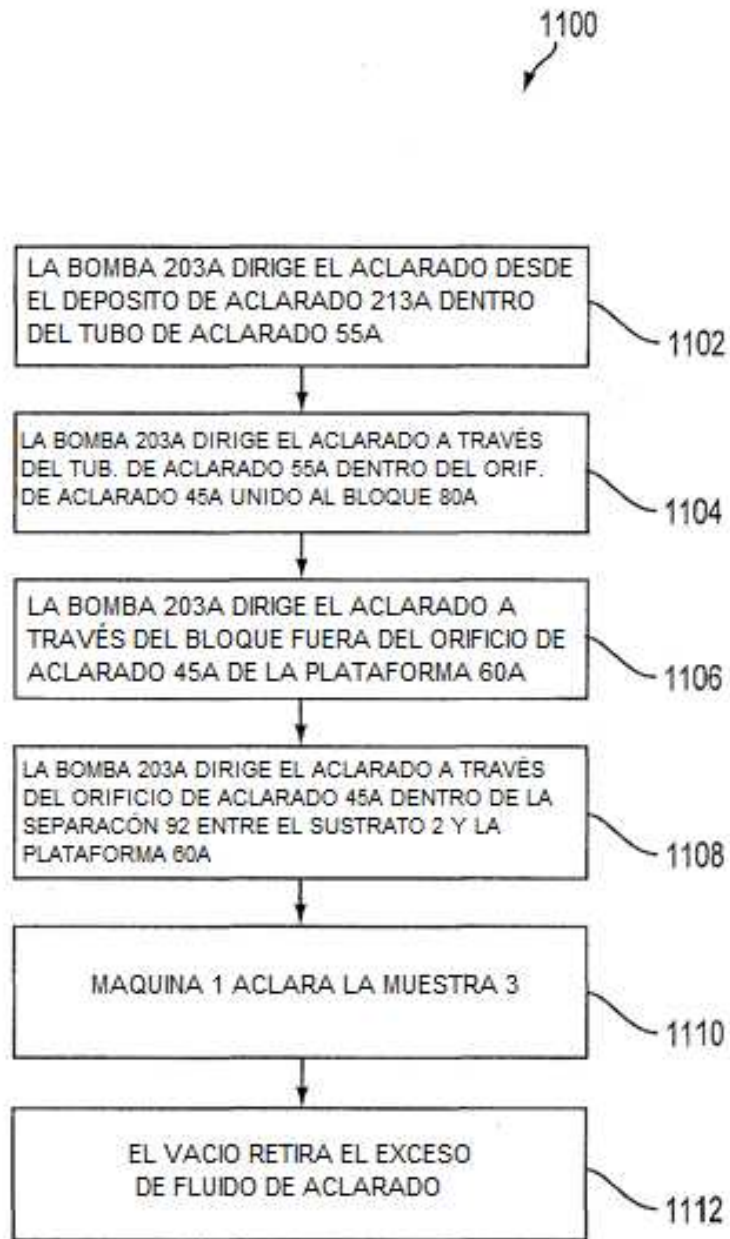


FIG. 12

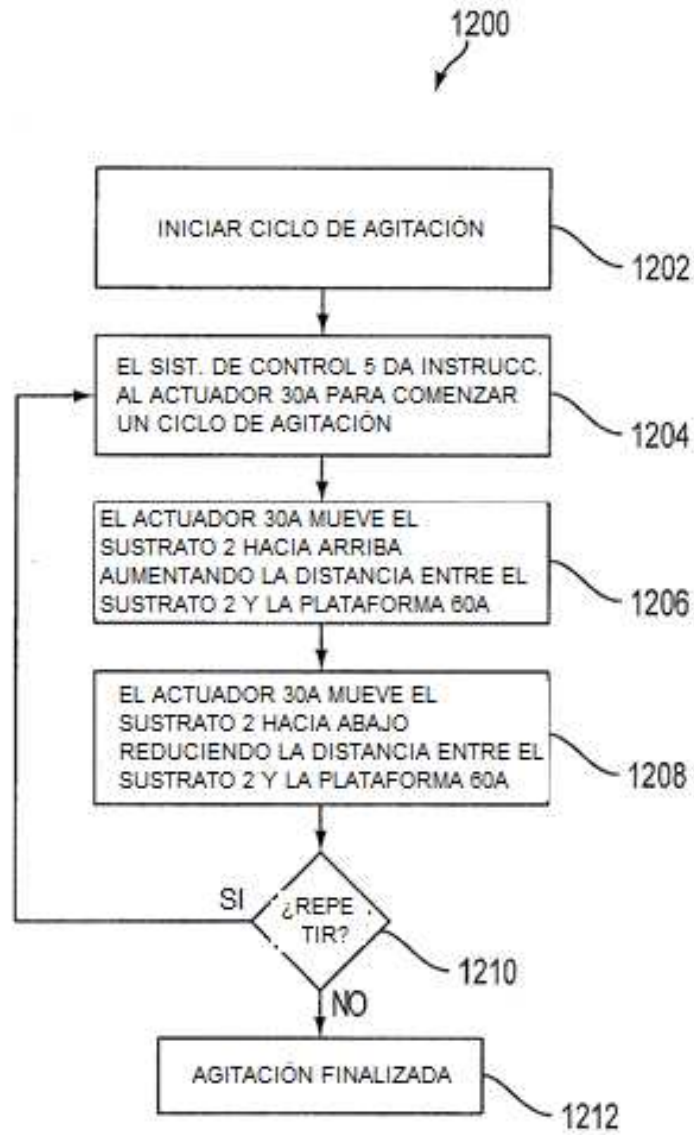


FIG. 13



FIG. 14

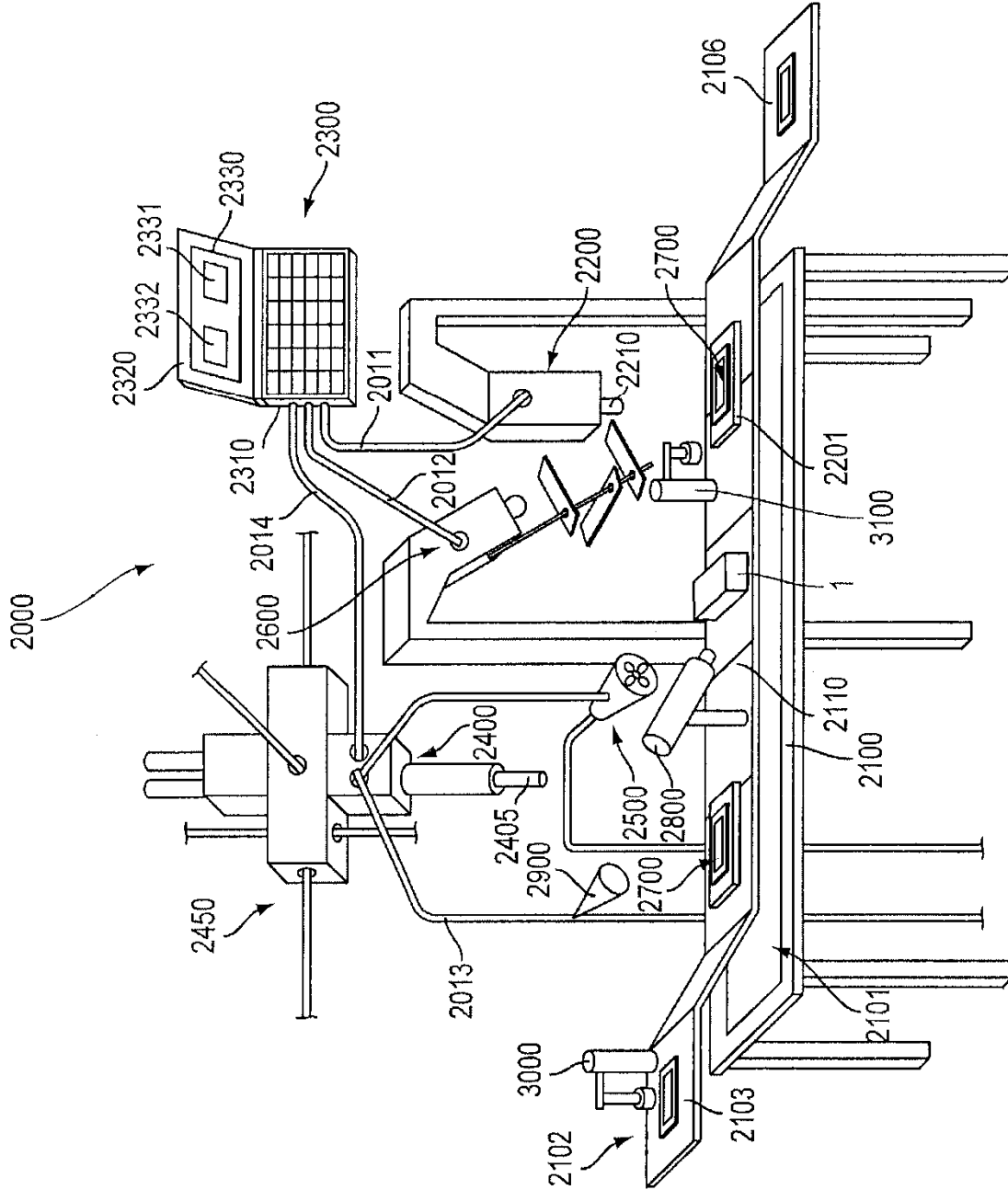


FIG. 15

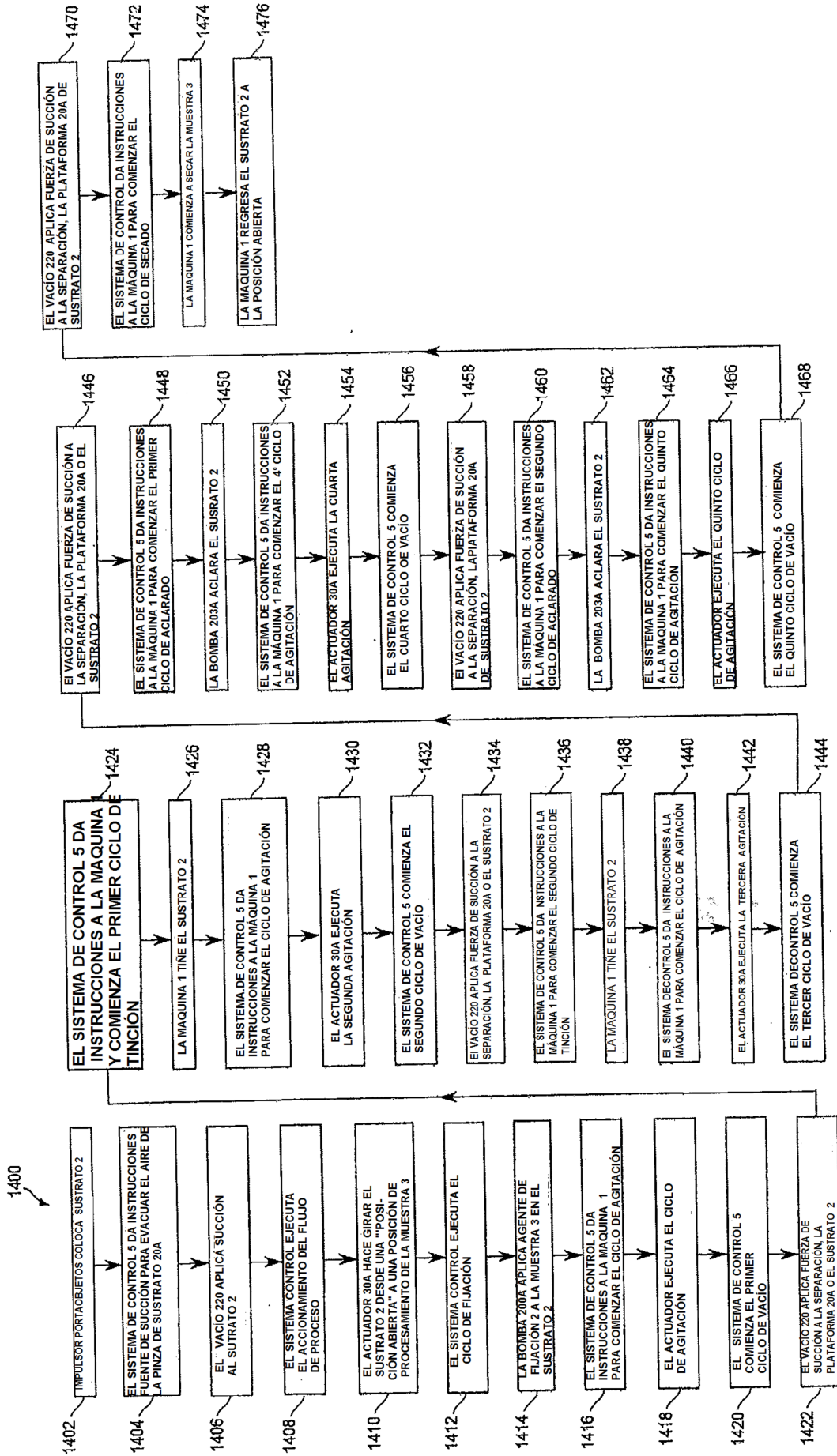


FIG. 16

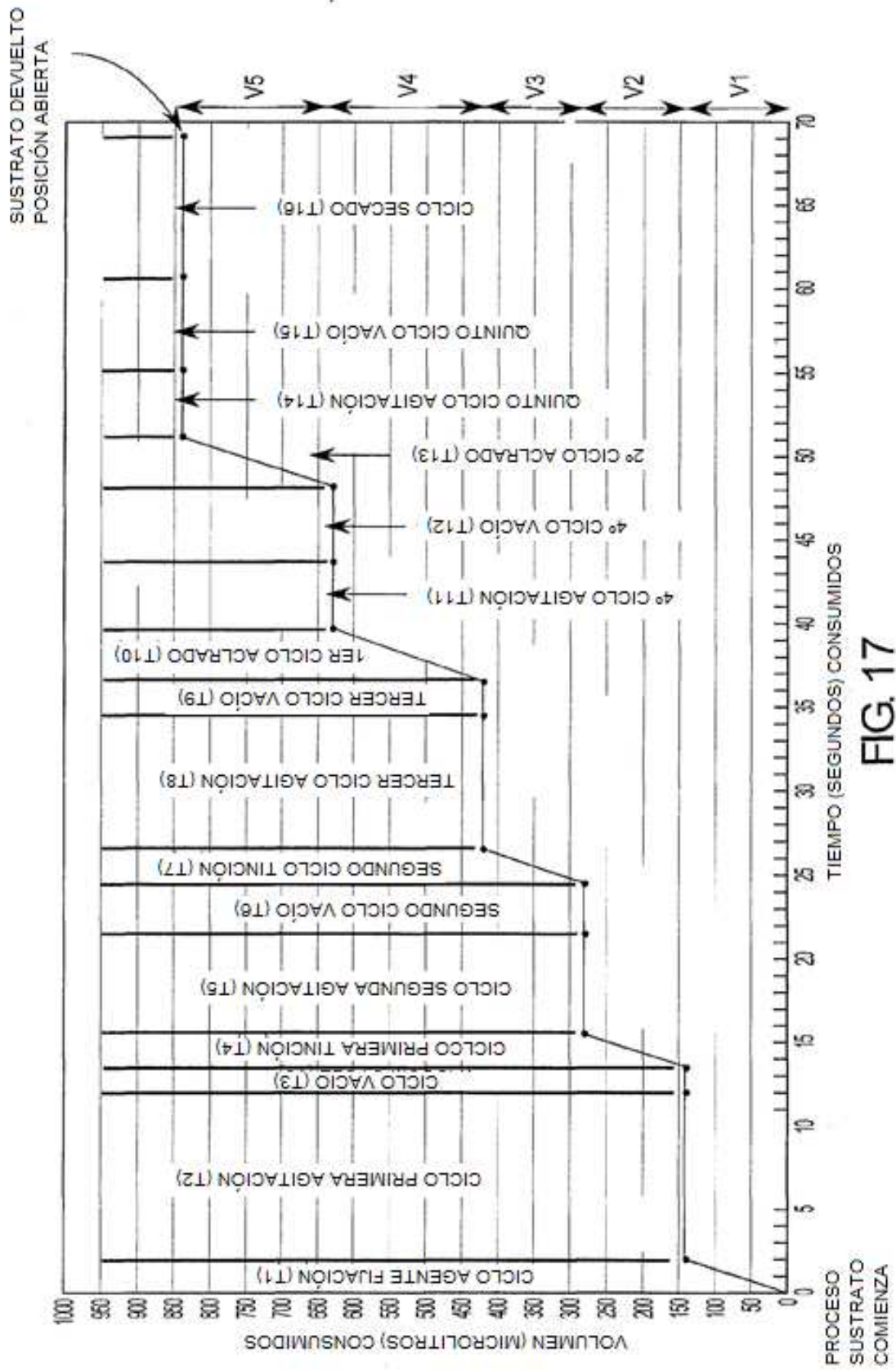


FIG. 17

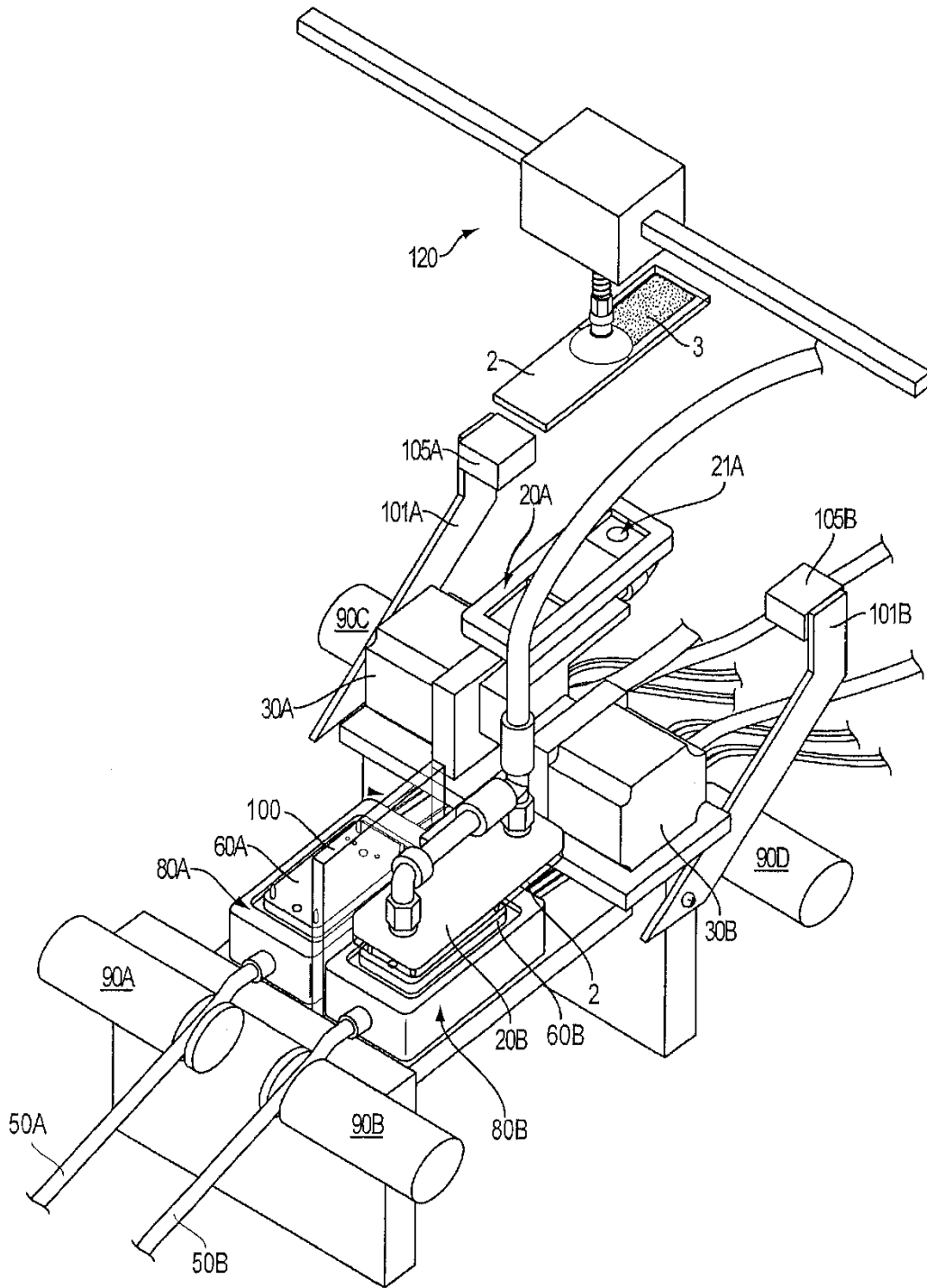


FIG. 18A

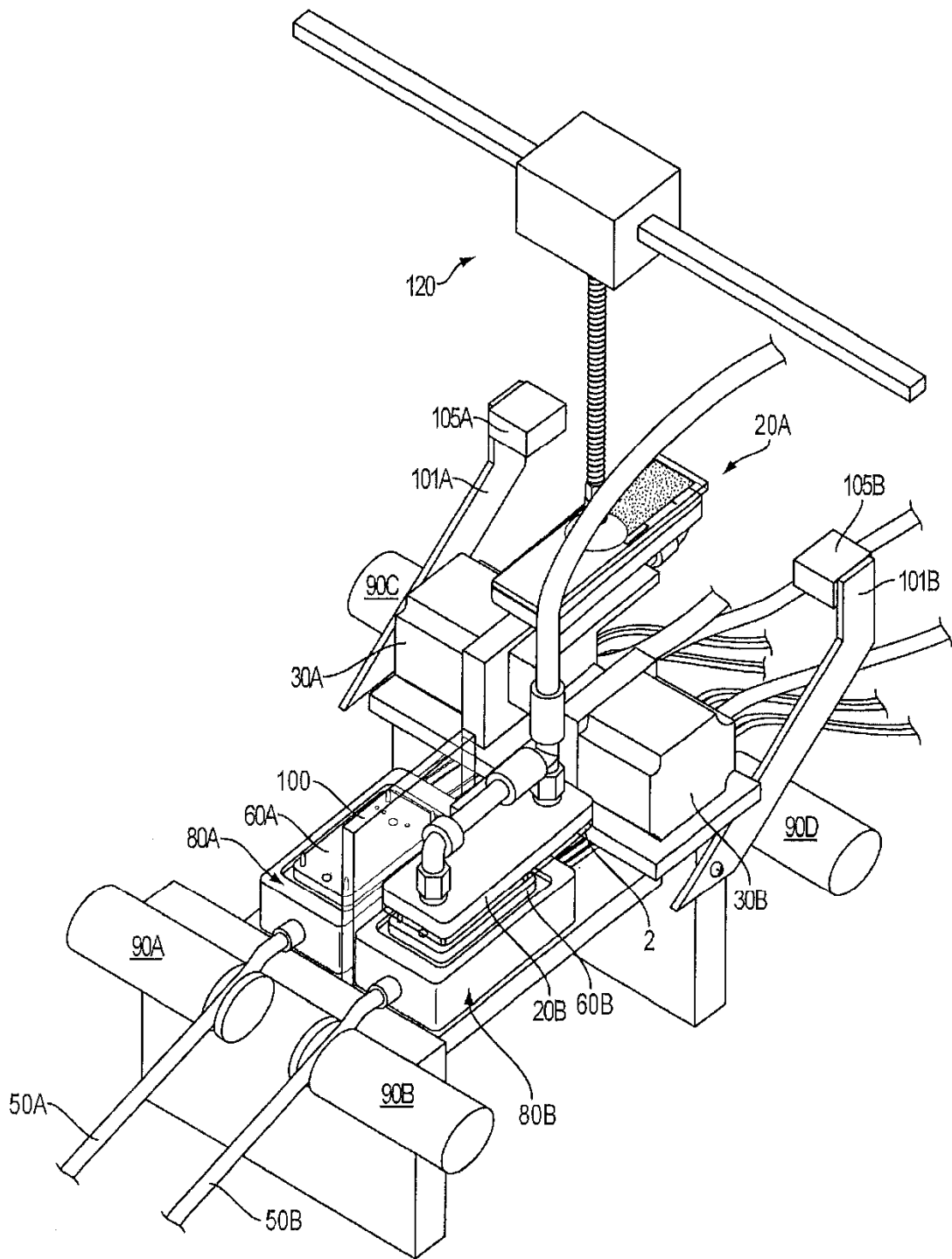


FIG. 18B