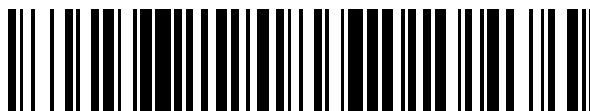


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 379**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2008** **E 08169465 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019** **EP 2191893**

54 Título: **Procedimientos de análisis y dispositivos para reacciones biológicas entre una fase líquida y una fase sólida**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2019

73 Titular/es:

**EUROIMMUN MEDIZINISCHE
LABORDIAGNOSTIKA AG (100.0%)
Seekamp 31
23560 Lübeck, DE**

72 Inventor/es:

**STÖCKER, WINFRIED;
RATEIKE, MARTIN;
MALTZAHN, BIANCA y
BEHRING, RASMUS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 728 379 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

Procedimientos de análisis y dispositivos para reacciones biológicas entre una fase líquida y una fase sólida

La presente invención se refiere a procedimientos y dispositivos especiales para llevar a cabo análisis inmunológicos, histoquímicos y citoquímicos, biomoleculares, enzimológicos, clínico-químicos y de otro tipo, por ejemplo en el diagnóstico médico de laboratorio, en los que se incuban correactantes enlazados a una fase sólida con reactantes disueltos en líquidos. Para ello se disponen sustratos de fase sólida sobre superficies de adhesión longitudinales de un portaobjetos y se ponen en contacto con líquidos, que se encuentran en acanaladuras de un portarreactivo - enfrentadas con exactitud a las superficies de adhesión, forzándose, en determinadas formas de realización, para la mezcla de los reactantes durante la incubación una convección potente de los correactantes disueltos en el líquido: Las reacciones se desarrollan rápidamente, las señales se intensifican y la reactividad de cada sustrato se hace más unitaria por toda la superficie de lo que puede conseguir el estado de la técnica. Si se examinan varias muestras yuxtapuestas, la disposición impide que los líquidos de las pruebas adyacente se mezclen unas con otras durante la incubación. Al final de la incubación lo portaobjetos se retiran de los portarreactivos y se evalúan los resultados. Ejemplos para la aplicación de la invención son la determinación de anticuerpos en el suero de pacientes con sospecha de enfermedades autoinmunitarias o infecciosas mediante inmunofluorescencia indirecta o inmunotransferencia y la genotipificación de muestras de paciente con ayuda de micromatrices.

Estado de la técnica

Para el campo de utilización de la invención se explica el estado de la técnica con un ejemplo procedente del diagnóstico analítico médico-inmunológico, la "prueba de inmunofluorescencia indirecta" para comprobar anticuerpos en suero de pacientes, véase la figura 1. El suero que va a examinarse o una dilución del mismo se lleva al contacto con un sustrato unido fijamente con un portaobjetos, que contiene antígenos que se corresponden con los anticuerpos que van a determinarse, y se incuba durante un tiempo determinado. Como sustratos se consideran entre otros: microcortes de tejidos biológicos, extensiones bacterianas, células o gotas de antígenos acopladas o secadas aplicadas en solución. En muestras positivas se unen ahora anticuerpos específicos del suero de pacientes a los correspondientes antígenos del sustrato, por ejemplo al ADN de los núcleos celulares de un corte histológico. anticuerpos contra ADN se encuentran entre otros en pacientes con la enfermedad del síndrome lúpico.

Tras la primera etapa de incubación se lavan anticuerpos excedentes, libres con solución tampón. El sustrato se incuba ahora una segunda vez, esta vez con un anticuerpo antihumano dirigido contra la inmunoglobulina humana, marcado con fluoresceína (este se obtuvo por ejemplo mediante inmunización de una cabra con inmunoglobulina humana). En el caso positivo se unen en la segunda etapa los anticuerpos marcados con los anticuerpos del suero de paciente ya enlazados. En una etapa de lavado adicional se retiran de nuevo anticuerpos excedentes, no enlazados. Después se instala medio de montaje, se coloca un cubreobjetos y el sustrato que se ha terminado de incubar se examina con el microscopio de fluorescencia. En muestras positivas los núcleos celulares del sustrato son fluorescentes en verde, cuando en el microscopio se irradian con luz (azul) de una longitud de onda de aproximadamente 488 nanómetros. En el caso de un resultado negativo los núcleos celulares permanecen oscuros. El cubreobjetos crea una superficie mate necesaria para una perfecta reproducción, paralela al sustrato y saliente en plano e impide además que el objetivo de microscopio entre en contacto directo con el sustrato. El medio de montaje llena el espacio entre sustrato y cubreobjetos y procura por ello una trayectoria de los rayos sin dispersión, contiene sustancias para la reducción de la degradación de la fluorescencia, su pH está ajustado a un rendimiento de fluorescencia máximo.

La inmunofluorescencia indirecta se utiliza a nivel mundial en el diagnóstico analítico, para analizar anualmente en millones de sueros de paciente autoanticuerpos o anticuerpos de infección. Para afrontar mejor la expansión de los exámenes, se intenta, resumir los desarrollos de trabajo y automatizar los procesos. Según el estado de la técnica general, por lo tanto en el laboratorio de diagnósticos se emplean portaobjetos con varios campos de reacción, para el examen paralelo de varios pacientes. Esta etapa de racionalización encierra el peligro de que en el caso de un modo de proceder descuidado los sueros dispuestos yuxtapuestos confluyan y a algunos pacientes se les dé erróneamente el diagnóstico de su portaobjetos vecino.

El estado de la técnica analítica de este campo de utilización hasta el año 1979 se describe en el documento EP 0 018 435¹. Allí se divulga también un nuevo tipo de incubación para la inmunofluorescencia indirecta, en la que los sueros de paciente y los reactivos no se instilan directamente sobre el portaobjetos, como hasta ahora era habitual, sino sobre campos de reacción hidrófilos de un portarreactivo plano, cuyo entorno es hidrófobo. El portaobjetos contiene sobre campos de reacción igualmente hidrófilos los sustratos, y estos se colocan con una distancia definida por encima del portarreactivo de modo que los sustratos aparecen en las gotas asociadas a ellos, por lo que las reacciones para todos los campos de un portaobjetos se inician al mismo tiempo. El número de las diluciones de suero que pueden examinarse por cada portaobjetos se corresponde con el número de sus campos de reacción. A las ventajas de esta técnica pertenece el hecho de que las gotas ya no pueden discurrir tan fácilmente unas hacia otras. La altura de gota está fijada y es constante y el inicio de las reacciones en la colocación de un portaobjetos sobre una gota previamente pipetada se realiza simultáneamente, por ello las reacciones de distintas pruebas pueden compararse mejor unas con otras. La evaporación se retarda y en los sustratos se fijan muchos menos precipitados de color molestos sin especificar, porque estas durante la incubación sedimentan en la dirección contraria.

Entre tanto la inmunofluorescencia indirecta se ha perfeccionado mediante una técnica de fragmentación especial (documento EP 0 117 262)²: Los sustratos (por ejemplo cortes congelados, células sembradas o extendidas, antígenos aislados acoplados etc.) no se fijan en este caso directamente sobre portaobjetos, sino primeramente sobre cristales delgados de por ejemplo 0,15 mm de espesor. A continuación estos cristales, junto con los sustratos que se adhieren a estos, se dividen en fragmentos de tamaño discrecional (biochips), y solo en este momento se fijan sobre portaobjetos- por ejemplo se pegan. La técnica de la fragmentación es adecuada especialmente para la producción en masa de sustratos, por es significativamente más sencilla y es más rápido elaborar un corte histológico algo mayor y dividirlo en biochips pequeños, que producir muchos cortes histológicos pequeños y montarlos directamente sobre portaobjetos. Aún más claro es el avance en la productividad de sustratos de cultivo celular o extensiones de células en superficies recubiertas con antígenos definidos. Además pueden componerse mosaicos discrecionalmente extensos de sustratos diferentes, de modo que con la misma gota de una dilución de suero o de la solución de reactante pueden examinarse perfiles de anticuerpo extensos^{3,4,5}. La invención se utiliza hoy en día a nivel mundial. Dispositivos y procedimientos para la fabricación en gran medida automatizada de tales portaobjetos se describen en la solicitud de patente europea PCT/EP/2005/000974 (2005)⁶.

El estado de la técnica adolece de una imperfección básica en cuanto a que concretamente durante las incubaciones no se proporciona una convección continua efectiva en la fase líquida. Las muestras o el líquido de reactivo están en contacto directo con las estructuras que contienen antígenos. Anticuerpos presentes correspondientes se enlazan con los antígenos diana, y su concentración en el entorno inmediato de los antígenos disminuye, mientras que uno o dos milímetros más lejos se presentan concentraciones de anticuerpos aún más altas. Solo mediante difusión el gradiente dentro del tiempo de examen no se degrada, y la medida propuesta en el documento citado EP 0 018 435 para generar una convección (variación periódica de la distancia entre portaobjetos y portarreactivo para la deformación de las gotas redondas sujetas entre ambos) no era ni de lejos lo suficientemente efectiva. El documento EP 0 075 605 muestra un dispositivo para llevar a cabo reacciones con un portaobjetos y un portarreactivo en cuyas superficies de adhesión longitudinales están instaladas acanaladuras.

Objeto de la invención

Se trataba de encontrar un modo en análisis inmunológicos, histoquímicos, biomoleculares, enzimológicos, clínico-químicos y de otro tipo, por ejemplo para el diagnóstico médico analítico, de incubar correactantes enlazados a una fase sólida con reactantes disueltos en líquido, presentándose el líquido de la fase sólida de un modo que no puede discurrir lateralmente, que las muestras adyacentes durante la incubación o durante los ciclos de lavado no entran en contacto entre sí y que para la mezcla de los reactantes durante la incubación o para el lavado efectivo puede forzar una convección potente en el líquido.

Descripción de la invención

Este objetivo se resuelve mediante un dispositivo según la reivindicación 1 y un procedimiento según la reivindicación 12. Formas de realización preferentes son objeto de las reivindicaciones dependientes correspondientes en cada caso.

Está previsto que un dispositivo para llevar a cabo análisis inmunológicos, histoquímicos y citoquímicos, biomoleculares, enzimológicos, clínico-químicos y de otro tipo presente un portaobjetos con una o varias superficies de adhesión longitudinales, por ejemplo en forma de tiras, y un portarreactivo con una o varias acanaladuras longitudinales. El portaobjetos puede unirse de manera separable con el portarreactivo de modo que las superficies de adhesión longitudinales estén enfrentadas en cada caso a una de las acanaladuras y discurran en paralelo o esencialmente en paralelo hacia estas y entonces, cuando correactantes enlazados a una fase sólida estén dispuestas en las superficies de adhesión longitudinales y se encuentren en las acanaladuras reactantes disueltos en líquido, los correactantes y reactantes están en contacto. Están previstos medios, para impedir un paso del líquido de una acanaladura a una acanaladura adyacente. Se prefiere que portaobjetos y portarreactivos presenten medios, con cuya ayuda pueda conseguirse que el portaobjetos y el portarreactivo en el estado unido estén dispuestos en una posición definida entre sí, es decir se produce una colocación lateral definida y/o una distancia definida. Tales medios pueden comprender por ejemplo salientes y depresiones asociados unos a otros, elementos de enclavamiento y/o topes. Además, puede ser ventajoso cuando el portaobjetos y/o el portarreactivo presentan medios, que pueden provocar la unión separable.

Al impedirse que el líquido durante el análisis pase entre las acanaladuras, pueden analizarse ventajosamente en las diferentes acanaladuras en paralelo varias muestras yuxtapuestas sobre un portaobjetos, sin que exista el peligro de que los líquidos de las pruebas adyacentes se mezclen unas con otras durante la incubación.

Las superficies de adhesión pueden estar dispuestas en la superficie de portaobjetos de modo que son planas con respecto a esta o están a ras de esta. Como alternativa entre superficies de adhesión adyacentes pueden estar previstas ranuras que discurran en paralelo de un extremo longitudinal de la superficies de adhesión al otro, pueden estar previstas depresiones o escalones longitudinales. De esta manera se consigue ventajosamente que las superficies de adhesión individuales estén desfasadas unas de otras y estén dispuestas en salientes propios en cada caso, longitudinales separados, es decir, por ejemplo están dispuestas elevadas en cierta manera sobre la superficie de portaobjeto.

Las acanaladuras del portarreactivo discurren en salientes longitudinales sobre la superficie de portarreactivo, estando separados unos de otros los salientes de acanaladuras adyacentes. De este modo por ejemplo los salientes individuales - y con ello las acanaladuras - pueden estar rebajados o separados mediante escotaduras que discurren en paralelo a las ranuras y entre estas desde un extremo longitudinal de las acanaladuras al otro o mediante un perfilado especial de tipo escalón.

Los bordes laterales de las ranuras terminan arriba en punta o están provistos con una arista cortante, y el portaobjetos y portarreactivo en el estado unido impiden que el líquido salga hacia los lados de las acanaladuras. Esto puede conseguirse en combinación con los bordes que terminan en punta al ser la distancia de los bordes desde las superficies de adhesión del portaobjetos tan reducida que el líquido se fija mediante fuerzas de adhesión desde abajo y arriba en la posición predeterminada contra una salida lateral. Se forma en cierta manera un "capilar ranurado a ambos lados", desde el que puede escaparse aire por los lados, pero no el líquido.

En una forma de realización preferida las superficies internas de las acanaladuras están equipadas con un perfil para guiar el líquido en las acanaladuras en dirección longitudinal. Un perfil de este tipo puede comprender por ejemplo una ranura que discurre en dirección longitudinal en el fondo de acanaladura.

Para aumentar la función de depósito para el líquido con el fin de realizar la protección de derramamiento las acanaladuras de los portarreactivos en la longitud llegan más allá de los extremos longitudinales de las superficies de adhesión de los portaobjetos. En otras palabras las acanaladuras son más largas que las superficies de adhesión, y en el estado unido de portaobjetos y portarreactivo las acanaladuras sobresalen en uno o preferentemente ambos extremos más allá de las superficies de adhesión. A este respecto puede ser particularmente ventajoso, cuando los bordes de las acanaladuras en estas partes que sobresalen de la superficies de adhesión están levantados hacia arriba o están elevados con respecto al resto de la acanaladura, para formar un depósito en forma de cuenco, que aloja líquido excedente.

Las acanaladuras del portarreactivo pueden estar hidrofílicas ventajosamente, para que el líquido pueda cargarse más fácilmente en las acanaladuras. Para ello preferentemente en las acanaladuras se introducen sustancias hidrófilas, que no perturban la reacción que va a realizarse más tarde.

En una configuración ventajosa alrededor de cada superficie de adhesión del portaobjetos está previsto un borde circundante, que sobresale con respecto a la superficie de adhesión. Este borde puede ser parte de la superficie de adhesión y formar su borde o puede estar dispuesto fuera de la superficie de adhesión. Es ventajoso cuando el borde está dimensionado de modo que para el análisis supera en altura sustratos de fase sólida que van a fijarse en las superficies de adhesión con correactantes enlazados a estos para reactantes disueltos en el líquido de acanaladuras y preferentemente en concreto ligeramente de modo que en la valoración posterior mediante un cubreobjetos colocado sobre el portaobjetos no se ejerce ninguna presión mecánica directa sobre el sustrato de fase sólida. En cualquier caso el borde impide entonces un derramamiento de medio de montaje desventajoso.

El portaobjetos y el portarreactivo están diseñados preferentemente de modo que en el estado unido de portaobjetos y portarreactivo las superficies de adhesión se sumergen en las acanaladuras, en la zona de contacto están situados a la altura del borde de acanaladura o por encima del borde de acanaladura y el líquidos situado en las acanaladuras antes de entrar en contacto con las superficies de adhesión o durante el contacto se arquea sobresaliendo del borde de acanaladura.

Para la identificación segura de los portaobjetos durante el examen al microscopio y para la asociación seguro a los portarreactivos al comienzo de la incubación los portaobjetos y los portarreactivos pueden proveerse ventajosamente con códigos legibles por máquina.

En un diseño ventajoso en la superficie superior o interna de las acanaladuras están previstas placas de desviación. Tal como se describe a continuación, el portaobjetos y portarreactivo en el estado fijado el uno al otro durante el análisis o la incubación se mueve preferentemente de modo que el líquido en las acanaladuras se mueve en vaivén alternando en la dirección longitudinal de las acanaladuras. A este respecto inundan las placas de desviación, y en estas se forman remolinos en el líquido, que proporcionan una mezcla mejorada del líquido.

Durante el análisis en las superficies de adhesión están dispuestos preferentemente sustratos de fase sólida o fases sólidas con correactantes enlazados en los mismos para reactantes disueltos en el líquido de acanaladura. Estos sustratos de fase sólida pueden disponerse en el curso de la fabricación de los portaobjetos o solo directamente antes del análisis. Los sustratos de fase sólida presentan preferentemente material biológico, que está seleccionado de: a) microcortes de tejidos biológicos, b) extensiones en células o grupos de células crecidas, c) extensiones de bacterias, d) virus, protozoos y parásitos, e) gotas de antígeno aplicadas en solución, endurecidas o acopladas, f) otros antígenos acoplados a una superficie y/o g) secuencias de nucleótidos discretionales.

Un dispositivo de este tipo puede emplearse ventajosamente en un procedimiento para llevar a cabo análisis inmunológicos, histoquímicos y citoquímicos, biomoleculares, enzimológicos, clínico-químicos y de otro tipo, en el que el portaobjetos de la manera descrita anteriormente se une con el portarreactivo de modo que las superficies de adhesión longitudinales están enfrentadas en cada caso a una acanaladura, se introduce líquido con reactantes disueltos en él en las acanaladuras, de modo que sustratos de fase sólida dispuestos en las superficies de adhesión

con correactantes enlazados en los mismos entran en contacto con el líquido, y portaobjetos y portarreactivo se mueven conjuntamente de modo que el líquido se mueven alternando en ambas direcciones longitudinales de las acanaladuras. Después de que se hayan incubado correactantes y reactantes de este modo, a continuación se analiza o se evalúa si, y dado el caso, en qué medida, ha tenido lugar una reacción entre estos.

- 5 A este respecto el movimiento preferentemente se realiza, o portaobjetos y portarreactivo preferentemente están diseñados de modo que en las acanaladuras el líquido de la composición de análisis durante los tiempos de reacción y el líquido de lavado durante los ciclos de lavado fluye tangencialmente por debajo de las superficies de adhesión.

En un diseño preferente del procedimiento se consigue una mezcla continua de cada fórmula de análisis individual, es decir del líquido en una acanaladura, durante el movimiento anterior al hacerse pivotar el portarreactivo junto con el portaobjetos situado encima periódicamente en la dirección longitudinal de las acanaladuras desde la horizontal en una medida en la que el líquido fluye de un lado a otro en dirección longitudinal de las acanaladuras y por ejemplo entre los extremos de las acanaladuras.

Es preferente que en el movimiento anterior se alcance una mezcla, preferentemente continua y completa, del líquido en cada acanaladura al ser mayor el volumen de líquido en cada mitad de ciclo movido de un extremo longitudinal de las acanaladuras de portarreactivo hacia el otro extremo que el volumen de líquido por debajo de las superficies de adhesión. Al incluirse el líquido en ambos extremos de cada acanaladura en la mezcla o en el intercambio continuo.

Es ventajoso además cuando la capacidad de las acanaladuras se adapta al volumen necesario para los análisis respectivos al predeterminar la profundidad de acanaladura.

En el marco del procedimiento pueden utilizarse ventajosamente por cada fórmula de análisis un sustrato de fase sólida (pruebas individuales) o varios sustratos de fase sólida (prueba de mosaico).

El procedimiento puede emplearse para la determinación de anticuerpos en el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias o infecciosas, alergias y tumores, pudiendo tratarse preferentemente de a) autoanticuerpos, b) anticuerpos contra microbios patógenos: bacterias, virus, protozoos, levaduras y parásitos, c) anticuerpos específicos de alérgenos de las clases de inmunoglobulina IgE y IgG, d) anticuerpos contra antígenos tumorales.

25 Los anticuerpos pueden examinarse ventajosamente a) con la técnica de la inmunofluorescencia directa o indirecta, b) con la técnica de inmunotransferencia, utilizando bajo esta micromatrices basadas en membranas de transferencia, o c) con la técnica de la luminiscencia.

Además el procedimiento ventajosamente empleando la invención puede utilizarse para la genotipificación de pacientes u otras muestras con ayuda de micromatrices.

30 El procedimiento puede llevarse a cabo preferentemente de manera automatizada o semiautomatizada. A este respecto se colocan preferentemente (a) el número de portarreactivos previstos para los exámenes en una posición definida sobre una mesa pivotante, (b) el tipo y número correspondiente de portaobjetos según el protocolo de incubación de acuerdo con el análisis se dispone sobre el portarreactivo, c) se producen diluciones de muestra adecuadas y se echan en las ranuras el portarreactivo previstas, d) que según el protocolo se efectúan una o varias etapas de incubación, poniéndose en movimiento la mesa pivotante y se provoca y provocándose una mezcla efectiva en las fórmulas individuales, e) entre las etapas de incubación individuales se intercalan ciclos de lavado, echándose el líquido de lavado en uno de los lados de las acanaladuras y aspirándose en el otro, mientras tanto los portaobjetos no necesitan retirarse de los portarreactivos, y f) los resultados de las variantes de prueba respectivas se evalúan de manera correspondiente. El dispositivo de acuerdo con la invención está adaptado preferentemente para la aplicación automática o semiautomática.

A continuación se explican con más detalle ejemplos de realización de la invención con referencia a las figuras.

La figura 1 representa esquemáticamente la "prueba de la inmunofluorescencia indirecta" como prueba de anticuerpos en el suero de pacientes de acuerdo con el estado de la técnica.

figura 2 muestra un ejemplo de realización de portaobjetos y portarreactivo de acuerdo con la invención.

45 figura 3 detalles adicionales del ejemplo de realización de acuerdo con la figura 2.

figura 4 muestra un ejemplo de realización adicional de portaobjetos y portarreactivo de acuerdo con la invención.

figura 5 muestra un ejemplo de realización adicional del portarreactivo de acuerdo con la invención.

Se crean portaobjetos (1) con una o varias superficies de adhesión (2) longitudinales, a las que se fijan los sustratos de fase sólida (3). Cada superficie de adhesión individual puede situarse de manera plana en la superficie de portaobjeto, o sobresale en versiones preferentes de la invención, separada de las superficies de adhesión adyacentes mediante ranuras (4), que discurren en paralelo desde un extremo longitudinal de las superficies de adhesión hacia el otro extremo, para delimitar unas de otras preparaciones de reacción adyacentes. Para la incubación los portaobjetos, con las superficies de adhesión hacia abajo, se colocan sobre portarreactivo (5) con acanaladuras longitudinales (6) y

se reúnen con estos provisionalmente para formar un "bloque". Las acanaladuras están enfrentadas a las superficies de adhesión de los portaobjetos en una posición exactamente definida y se llenan en un momento dado con el líquido de muestra o el reactivo líquido. Sobresalen hacia arriba (en formas de realización especiales a modo de escalón) y están desfasadas hacia los lados mediante un perfilado especial. De este modo el portarreactivo además de las acanaladuras puede presentar escotaduras (7) que discurren en paralelo desde un extremo longitudinal hacia el otro, para delimitar unas de otras preparaciones de reacción adyacentes. El líquido de las acanaladuras se levanta contra las superficies de adhesión de los portaobjetos, de modo que se forma un "capilar ranurado a ambos lados, desde el que puede escaparse aire, pero el líquido se sujeta desde abajo y desde arriba mediante fuerzas de adhesión en la posición prevista. Los bordes de las acanaladuras terminan arriba en punta o están provistos con una arista cortante, para impedir que el líquido salga hacia los lados. El líquido en determinadas formas de realización en los extremos longitudinales de las superficies de adhesión puede entrar desde un rebaje de la acanaladura hacia los capilares o abandonarlos desde allí.

Los portaobjetos antes del llenado de las acanaladuras con el líquido ya pueden llevarse a la posición prevista para la incubación, o el líquido ya se carga previamente en las acanaladuras, y los portaobjetos se colocan solamente después, en este caso todas las reacciones comienzan durante la colocación del portaobjetos simultáneamente. La geometría de cada bloque está determinada de modo que los sustratos de fase sólida entran en contacto con el líquido sujeto por las acanaladuras. En algunas formas de realización para ello los campos de adhesión se sumergen en las acanaladuras, en otras formas de realización los campos de adhesión están situados a la altura del borde de acanaladura, en otros de nuevo están situados a más altura, y el líquido se arquea por encima del borde de acanaladura. Se producen portarreactivos con diferentes profundidades de acanaladura, orientándose según el volumen necesario para los análisis respectivos. Asimismo puede adaptarse el ancho de las superficies de adhesión y de las acanaladuras a la demanda.

El producto compuesto de portaobjetos y portarreactivo (bloque) puede inclinarse ahora rítmicamente mediante movimientos de balanceo con frecuencia discrecional de tal modo que el líquido fluye desde un extremo longitudinal de las superficies de adhesión y acanaladuras hacia el otro, y después de nuevo de vuelta. Para finalizar la incubación los portaobjetos se extraen de los portarreactivos y las reacciones se evalúan. En el caso de la prueba de inmunofluorescencia indirecta se pone en contacto medio de montaje con los sustratos de antígeno de las superficies de adhesión y por cada portaobjetos se coloca un cubreobjetos, después se examina al microscopio.

Cada superficie de adhesión puede presentar un borde (8) que discurre alrededor, que supera solo ligeramente la altura de los sustratos, pero que cumple tres funciones importantes: La primera el borde facilita el posicionamiento de los fragmentos de vidrio (biochips) que soportan el sustrato, que por ejemplo durante la adhesión ya no pueden resbalar sin más de manera involuntaria. En segundo lugar el borde protege los sustratos: El cubreobjetos colocado al final se mantiene alejado de los cortes histológicos o células a una pequeña distancia, definida y puede dañarlos de este modo mucho menos, lo que en el caso de técnicas convencionales ocurre con frecuencia, donde el cubreobjetos se apoya directamente sobre el material biológico revestido con medio de montaje. Y en tercer lugar el medio de montaje se fija entre superficies de adhesión y cubreobjetos y no puede salir desde allí: Los sustratos no se secan, por lo que se volverían inservibles, y la pletina del microscopio no se ensucia. Mediante el borde circundante (8) el cubreobjetos solamente eleva en el sentido de que la distancia de trabajo del objetivo de microscopio común desde la lente frontal hasta el plano de los cortes histológicos o células no se supera. La superficie de los portaobjetos puede estar provista de escotaduras (bordes externos de las escotaduras: 9), en las que puede enclavarse el cubreobjetos, para que en el examen al microscopio no resbale hacia los lados.

En comparación con el documento EP 0 018 435 ya citado, en el que tanto portaobjetos como portarreactivo necesitan campos hidrófilos en un entorno hidrófobo requieren el posicionamiento del líquido con respecto al sustrato de fase sólida, en la presente invención no es necesario un revestimiento hidrófilo/hidrófobo de los portaobjetos o de los portarreactivos. Sin embargo ha resultado ser útil hidrofilar las acanaladuras de los portarreactivos, para que el líquido pueda echarse más fácilmente, esto puede conseguirse por ejemplo mediante rociado de sustancias hidrófilas (que no perturban la reacción que se realiza posteriormente), que, dado el caso se dejan endurecer. Las acanaladuras pueden estar equipadas con perfiles adecuados para guiar el líquido, por ejemplo con una acanaladura (10) o varias acanaladuras en el fondo de la acanaladura, para influir de manera favorable en el comportamiento de flujo durante el llenado con líquido de muestra o reactivos y durante la operación de balanceo. Para fomentar la convección y por ello para acelerar la operación de mezcla pueden incorporarse también placas de desviación en la superficie de las acanaladuras, en las que se forman remolinos durante el desbordamiento.

Las acanaladuras poseen en ambos extremos longitudinales depósitos para el líquido - están configurados por ejemplo más largos (11) que las superficies de adhesión de los portaobjetos. El líquido sale entonces en los movimientos basculantes más allá del extremo de las superficies de adhesión (12), y la mezcla deseada de la muestra durante toda la incubación se vuelve todavía más eficiente, en particular, cuando el volumen de líquido de las acanaladuras en la parte que supera en altura a los portaobjetos a ambos lados se diseña en cada lado mayor que el volumen entre medias, en la zona de las superficies de adhesión. La sección sobresaliente de las acanaladuras sirve además como depósito para alojar un excedente de líquido, con el fin de proteger al sistema contra alteraciones mediante un pipeteo impreciso. En esta posición se echan y se aspiran también líquidos de muestra, de reactivos y líquido de lavado, mientras que los portaobjetos están colocados sobre los portarreactivos. La invención en comparación con el estado de la técnica en conjunto es adecuada especialmente para el procesamiento automático de grandes series de análisis.

Permite entre otros, lavar las preparaciones después de cada etapa de incubación de manera eficiente, sin retirar los portaobjetos: En un extremo longitudinal se añade líquido de lavado, en el otro se aspira al mismo tiempo. A este respecto el líquido pasa tangencialmente delante de los sustrato de fase sólida, lo que es especialmente eficaz y acorta tanto el ciclo de lavado como ahorra grandes volúmenes de líquido de lavado. El lavado puede realizarse en intervalos, o también continuamente. Durante el lavado en el durante el ciclo los bloques de portarreactivos y portaobjetos se inclinan ligeramente principalmente en diagonal, hacia o contra la dirección de flujo.

Hasta ahora en la realización manual de la prueba de inmunofluorescencia indirecta era habitual, lavar las muestras o reactivos con un chorro generoso de líquido de lavado de los portaobjetos, a continuación los portaobjetos sucesivamente se ponen en dos o tres cubetas con líquido de lavado nuevo en cada caso, después se extraen y se secan alrededor de los campos de reacción y del revés, finalmente los reactivos o medio de montaje se añaden por goteo. Los portaobjetos de la presente invención ya no necesitan lavarse en conjunto y solamente en la zona de sus superficies de adhesión entran en contacto con líquido potencialmente infeccioso. Y sobre las superficies de adhesión se coloca al final también un cubreobjetos, de modo que en el examen al microscopio de los portaobjetos apenas se desprende peligro de infección.

Las acanaladuras de los portarreactivos sobresalen más allá de los portaobjetos (11) y sus bordes están trazados hacia arriba, para formar por así decirlo un "cuenco" (13), para aumentar la función de depósito en los extremos y para proteger que el líquido salga y quizá incluso pase a la fórmula de reacción adyacente. Como medida preventiva con la misma meta pueden preverse también rebajes (14) en el borde de portaobjetos entre las superficies de adhesión. Además, fuera de la zona de las superficies de adhesión en los portaobjetos pueden instalarse muescas o salientes (15), que se corresponden con piezas complementarias (16) correspondientes de los portarreactivos.

Por ello se garantiza que los portaobjetos se coloquen en la orientación correcta. En los extremos de los portaobjetos puede instalarse un código, arriba o abajo, para la identificación segura en la colocación de los portaobjetos en los portarreactivos al comienzo de la incubación o en el examen al microscopio. En el lado inferior de los portaobjetos pueden preverse listones planos delgados, sobre los cuales se deslizan portaobjetos en el examen al microscopio, después no se quedan pegados sobre la pletina, en el caso de que esta alguna vez esté manchada de aceite o de medio de montaje de un portaobjetos del estado de la técnica anterior. Los portaobjetos pueden achaflanarse algunos grados en el lado inferior en los extremos: Cuando allí desde arriba se ejerce con los dedos una presión reducida, puede inclinarse ligeramente los portaobjetos y levantarse ligeramente de la mesa de laboratorio o de la pletina del microscopio.

Las reacciones de la inmunofluorescencia indirecta en los cortes histológicos o sustratos de células incubados de acuerdo con la invención resultan ser reproducibles de manera notable, totalmente al contrario que en la técnica convencional: En un portaobjetos convencional una gota más o menos redonda está situada por encima del sustrato, por ejemplo un corte histológico. En el centro del campo la gota con frecuencia es más alta que en el exterior, entonces en el centro se ven reacciones más intensas, dado que aquí están presentes más anticuerpos. Sin embargo también se produce el fenómeno inverso: Donde la gota supera en altura el borde del corte histológico, se pone a la disposición de los antígenos desde el exterior correactantes adicionales. Con frecuencia puede observarse otro efecto adicional grave: Debido a la curvatura mayor de la superficie en el borde de la gota allí el líquido se evapora de manera esencialmente más rápida que en el centro, fluye continuamente líquido hacia afuera, y se desarrolla un gradiente de concentración considerable de los anticuerpos - después el borde del corte histológico reacciona de manera esencialmente más potente que el centro, por lo que parcialmente en más de diez veces se simulan concentraciones de demasiado altas. (Este fenómeno puede observarse en cualquier momento también en la vida cotidiana: Sobre una superficie lisa una gota de café seca produce una mancha, que en el interior es bastante clara, y en el borde es casi negra.) En el caso de cortes histológicos incubados de acuerdo con la invención las estructuras histológicas en cada punto de una fórmula muestran reacciones de igual intensidad. Este progreso se consiguió al mezclarse los reactantes en el líquido de manera efectiva continuamente durante las incubaciones- un punto especialmente fuerte de esta invención, y una de las condiciones para una estandarización del diagnóstico de inmunofluorescencia.

A consecuencia de la convección forzada de los correactantes disueltos y de la mezcla continua completa de cada fórmula de análisis individual, en la presente invención se obtiene adicionalmente señales esencialmente más intensas en comparación con un sistema en reposo, porque siempre se presenta la concentración máxima de los reactantes situados en el líquido en el sustrato de fase sólida y también de aquellos reactantes del líquido entran en contacto con los correactantes del sustrato de fase sólida, que debido al recorrido demasiado largo durante el curso de la incubación no se hubieran creado solo mediante difusión. Finalmente en la incubación de acuerdo con la invención el límite de saturación de las reacciones se alcanza más rápidamente que en el estado de la técnica, por lo que el tiempo de incubación por ejemplo para la inmunofluorescencia indirecta puede acortarse en un tercio.

Ejemplos

Una de las aplicaciones más importantes para la nueva invención es el diagnóstico serológico de anticuerpos mediante inmunofluorescencia indirecta en los análisis clínicos. El nuevo procedimiento y los dispositivos correspondientes sin embargo son adecuados también para llevar a cabo muchos otros análisis inmunológicos, histoquímicos y citoquímicos, biomoleculares, enzimológicos, clínico-químicos y de otro tipo, para investigaciones empleando inmunotransferencias, micromatrices o para procedimientos fluorométricos y luminométricos y otros procedimientos

de análisis, por ejemplo en el diagnóstico médico de laboratorio, en los que se incuban correagentes enlazados a una fase sólida con reagentes disueltos en líquidos. Asimismo para la inmunofluorescencia directa.

Ejemplo 1: Prueba de anticuerpos contra granulocitos mediante inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de la granulomatosis de Wegener

Para análisis individuales se equipa a cada superficie de adhesión de un portaobjetos con un sustrato en cada caso. Para ello en este caso se extienden granulocitos aislados sobre un cubreobjetos y se fijan durante 10 minutos en 96 % de etanol a temperatura ambiente. Después el cubreobjetos con ayuda de un diamante corta-vidrios se divide en fragmentos de tamaño 1 x 1 milímetros. Cada uno de estos fragmentos se pega sobre cada una de 10 superficies de adhesión del portaobjetos (el adhesivo se encuentra entre superficie de adhesión y lado inferior del biochip, los granulocitos están situados libremente en la superficie). El portaobjetos, se coloca con los biochips hacia abajo sobre un portarreactivo con diez acanaladuras enfrentadas a las superficies de adhesión. El portaobjetos tiene un ancho de 26 milímetros, las superficies de adhesión una longitud de 24 milímetros. Las acanaladuras en ambos extremos longitudinales de las superficies de adhesión sobresalen en cada caso 10 milímetros.

Ahora con la mano en las diez acanaladuras se echan con una pipeta en cada caso 100 microlitros 1:10 de suero diluido en PBS (una solución de cloruro de sodio fisiológica acuosa y tamponada con fosfato a un pH de 7,4) de diez pacientes diferentes. Las acanaladuras están dimensionadas de tal modo que ahora el líquido entra en contacto con los granulocitos. Después el portarreactivo junto con portaobjetos situado sobre el mismo se hace pivotar periódicamente en la dirección longitudinal de las acanaladuras 30 ° desde la horizontal, de modo que el líquido fluye en vaivén de un extremo al otro, con una duración de ciclo de 15 segundos por cada ciclo. El volumen en la zona de las superficies de adhesión asciende en cada caso a 20 microlitros, el volumen movido en cada mitad de ciclo está diseñado de modo que es claramente mayor, en este caso 30 microlitros, por lo que el líquido en ambos extremos de las acanaladuras de cada fórmula de prueba individual se incluye en el intercambio continuo, y se produce una mezcla continua potente y rápida de toda la fórmula de cada muestra. Durante las incubaciones el bloque de portarreactivo y portaobjetos se cubre con una cubierta, para que el líquido no se evapore de manera demasiado rápida y las preparaciones de análisis no se sequen.

Después de 30 minutos la dilución de suero se aspira desde un extremo de las acanaladuras, desde (preferentemente, pero no exclusivamente) otro extremo para el lavado se introduce PBS en pipetas- 5 minutos junto con 10 mililitros por cada acanaladura. Las acanaladuras se aspiran hasta vaciarse y se echan 100 microlitros de una dilución adecuada de una inmunoglobulina antihumana marcada con fluoresceína de una cabra (en este caso son concebibles muchas otras fuentes de anticuerpo o reagentes de anticuerpos similares, pero también muchas otras sustancias de marcación). El reactivo recibe a este respecto de nuevo contacto con las superficies de adhesión y los sustratos de antígeno fijados a las mismas. El bloque de portarreactivo y portaobjetos se balancea otra media hora, después de nuevo se lava de la misma forma. Al final las acanaladuras se aspiran de nuevo hasta vaciarse, el portaobjetos se retira del portarreactivo, sobre las superficies de adhesión se añaden por goteo en cada caso 15 microlitros de medio de montaje (con PBS de glicerina tamponada 1:10 a un pH de 8,4, añadiendo 0,1 % de azida de sodio y 2 % 1,4-diazabicio[2.2.2] octano como protección contra el descoloramiento) y se coloca un cubreobjetos por encima, que se enclava e una escotadura correspondiente en los bordes del portaobjetos. Las reacciones se examinan bajo el microscopio de fluorescencia.

Ejemplo 2: Prueba de anticuerpos contra núcleos celulares, mitocondrias y músculos lisos mediante inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de diferentes enfermedades reumáticas

Sobre cada una de diez superficies de adhesión de un portaobjetos de acuerdo con la invención (por ejemplo con las medidas estándar 76 x 26 milímetros) se pegan de manera similar al primer ejemplo fragmentos de vidrio revestidos (biochips), en este caso sin embargo como un "mosaico", con las siguientes sustancias: células epiteliales humanas fijadas con acetona del cultivo celular, extensiones fijadas con etanol del hemoflagelado *Crithidia luciliae*, cortes congelados sin fijar de los órganos de rata: hígado, riñones, estómago, además biochips, que están recubiertas de manera plana o en forma de puntos (de acuerdo con Proost y col. ⁷⁾ con los siguientes antígenos individuales: ADN bicatenario, histona H1, los antígenos de núcleo celular Sm, RNP, SS-A, SS-B, Scl-70 y nucleosomas, así como con el antígeno citoplasmático Jo-1 -junto con cada superficie de adhesión con 15 sustratos de antígeno diferentes. incubación y valoración se realizan de la misma forma que en el ejemplo 1, en paralelo para los diez pacientes del portaobjetos. Se experimenta al final de la investigación, si en el suero de cada uno de estos pacientes se presenta o no uno o varios de un espectro de al menos 15 autoanticuerpos diferentes. La disposición de los sustratos sobre las superficies de adhesión y la incubación en cooperación con las ranuras del portarreactivo permite, realizar esta multitud de parámetros para diez pacientes yuxtapuestos, ¡son 150 análisis individuales sobre un único portaobjetos! Dado que el líquido no puede discurrir entre las muestras adyacentes, quedan casi descartadas reacciones cruzadas de manera involuntaria y diagnósticos erróneos correspondientes.

Cada laboratorio médico de alto nivel está interesado en poder examinar perfiles de autoanticuerpos. Hay muchos planteamientos clínicos, en los que el diagnóstico diferencial es útil: Por un lado, en algunos síndromes clínicos se consideran en cada caso algunas enfermedades autoinmunitarias (en una nefritis) por ejemplo un síndrome de Goodpasture, la granulomatosis de Wegener, un lupus eritematoso sistémico o una glomerulonefritis progresiva (rápida), por otro lado, varios autoanticuerpos pueden estar correlacionados con una enfermedad autoinmunitaria

determinada (con una cirrosis biliar primaria por ejemplo anticuerpos contra mitocondrias o contra puntos nucleares, gp210 y PML, con un anticuerpo de lupus eritematoso sistémico contra nDNS, Sm, histona, proteína P ribosomal, antígeno nuclear de proliferación celular, cardiolipina, Beta-2 glicoproteína, etc., con anticuerpos de tiroiditis autoinmunitaria contra peroxidasa específica del tiroides, tireoglobulina, receptores TSH y células parietales del estómago). La presente invención es particularmente adecuada para crear perfiles de anticuerpos. Esto no se limita al diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias, hay muchos otros campos de aplicación, entre otros el cribado de anticuerpos monoclonales (por ejemplo contra antígenos asociados a tumores) en sobrenadantes de fusión ⁸ o la serología de enfermedades infecciosas, como muestra un ejemplo análogo:

Ejemplo 3: Incubación paralela de 50 portaobjetos con 10 superficies de adhesión en cada caso como prueba de anticuerpos humanos contra bacterias, virus, protozoos, levaduras y parásitos mediante inmunofluorescencia indirecta - 40 parámetros por paciente

Los portaobjetos con los sustratos de fase sólida se producen de manera similar al ejemplo 2, no obstante en este caso se utilizan fragmentos de vidrio con los siguientes sustratos de antígenos de infección: virus de sarampión, virus de paperas, virus de rubeola y células de cultivo infectadas con otros virus discrecionales, todas las extensiones de bacterias o de hongos posibles, cortes congelados de larvas de equinococo, extensiones de toxoplasma gondii, pero asimismo superficies con antígenos definidos, aislados puramente más o menos bioquímicamente, producidos parcialmente con técnicas de recombinación. Las incubaciones son asistidas por una máquina, que diluye los sueros de pacientes, echa las diluciones de suero y los reactivos en el momento dado en las acanaladuras de los portarreactivos y lleva a cabo en paralelo procedimientos de lavado con ayuda de pipetas y cánulas de aspiración diseñadas con diez canales a modo de peine.

Durante las incubaciones y parcialmente también durante el lavado todos los bloques de portarreactivos con sus portaobjetos correspondientes se inclinan rítmicamente de un extremo longitudinal a otro de los "capilares divididos" y de vuelta, para proporcionar la convección deseada. El movimiento basculante se detiene dado el caso (solo) en aquellos bloques, en los que en ese momento se llevan a cabo operaciones de pipeteo o de lavado. Por ello queda garantizado que la operación de mezcla no tenga que interrumpirse continuamente para la fórmula total. Es asimismo concebible que todo el dispositivo, incluyendo la instalación de pipetado, esté instalada sobre una gran mesa basculante, de modo que tampoco aquellos bloques, en los que se desarrollan precisamente acciones de pipetado y de lavado, tengan que realizar ninguna pausa durante el balanceo. El montaje se realiza (en primer lugar todavía) manualmente, la lectura en el microscopio (en primer lugar todavía) visualmente.

Ejemplo 4: Examen de anticuerpos IgE- o IgG específicos con una micromatriz basada en membrana de transferencia en el diagnóstico de alergias

En la técnica de inmunotransferencia se inmovilizan proteínas u otros antígenos sobre membranas de nitrocelulosa, nailon u otras membranas, que después sucesivamente se incuban con muestras de paciente u otras muestras, anticuerpos marcados con enzimas y un reactivo de color. Las reacciones positivas representan sobre las franjas de membrana precipitados de color, que se evalúan visualmente o automáticamente con sistemas de escáner o de cámara ^{9, 10}.

Sobre cada una de las diez superficies de adhesión de un portaobjetos de acuerdo con la presente invención en tres filas paralelas se pegan chips de membrana cuadrados de 3 x 26 con una longitud de arista de 1 milímetro. Cada chip de membrana contiene un alérgeno definido acoplado a una membrana (polen de abedul, veneno de avispa etc). Las incubaciones se realizan de manera similar como en los ejemplos anteriores, no obstante en la segunda etapa de incubación se utiliza un anticuerpo IgE- antihumano marcado con enzimas, a la que se une también una etapa de lavado y una reacción de indicador. El caso positivo se precipita un colorante sobre el chip de membrana.

Se obtiene sobre un único portaobjetos de 76 cm x 26 cm para diez pacientes un perfil de alergia encada caso con 78 parámetros. La utilización de chips de membrana de acuerdo con la invención no se limita solamente al diagnóstico de alergias.

Ejemplo 5: Genotipificación de muestra de paciente con ayuda de micromatrices

Sobre las superficies de adhesión de un portaobjetos de acuerdo con la presente invención se fijan en cada caso, micromatrices específicas que portan secuencias nucleotídicas, por ejemplo cinco micromatrices con en cada caso 50 puntos de oligonucleótidos diferentes ^{11, 12}. De los leucocitos de diez pacientes se extrae ADN. De esto se amplifican secuencias diana previamente fijadas mediante reacción múltiple en cadena de la polimerasa y se marcan con el genotipo específico. Para la hibridación se echan en las acanaladuras de un portarreactivo de acuerdo con la invención y se ponen en contacto con las micromatrices sobre las superficies de adhesión de los portaobjetos. Para finalizar se realiza la evaluación de las reacciones con un escáner de micromatrices especial.

Precisamente el examen biomolecular de las cantidades más pequeñas de ácido nucleico con micromatrices impone la condición de que las reacciones puedan reproducirse de manera inequívoca, y que sean muy sensibles, lo que se garantiza especialmente mediante la mezcla efectiva continua del líquido de reacción durante las incubaciones, en primera línea a consecuencia de la convección forzada. También en este caso el diagnóstico se beneficia de esta invención en cuanto a los tiempos breves de incubación.

Capacidad de automatización de la invención

Hasta hoy la inmunofluorescencia indirecta en la práctica de laboratorio es un dominio del procesamiento manual individual y valoración visual. El estado de la técnica analítica en este campo no ha valido para crear soluciones de automatización con un elevado rendimiento de muestras, como por ejemplo para la química clínica. El dilema puede demostrarse en dos sistemas disponibles en el mercado: La empresa DAS srl (Roma, Italia) ofrece una máquina de incubación en (AP16 IF Plus) y la empresa Menarini srl (Florencia, Italia) asimismo (Zenit SP Plus). Ambos sistemas pipeteen la solución de incubación directamente sobre los campos de los portaobjetos. A este respecto mediante una confluencia de las gotas de líquido de campos contiguos pueden producirse diagnósticos erróneos, especialmente cuando la superficie de portaobjeto después de la primera etapa de lavado se ha humedecido fuera de los campos de reacción - en la presente invención las muestras adyacentes en cambio están separadas unas de otras de manera segura. Ofrece mejores condiciones para una automatización frente a sistemas existentes, en los que las operaciones de pipeteo y de lavado debido a la propensión a fallos deben vigilarse continuamente.

Además, en caso de ambos aparatos los líquidos se pipetan directamente sobre los campos de los portaobjetos, esto, en caso de un ajuste inadecuado, puede llevar a un deterioro de los sustratos mediante las cánulas - en la presente invención esto queda descartado, porque los sustratos de fase sólida no entran en contacto con las cánulas: El líquido se echa fuera de los portaobjetos en las acanaladuras, que además están enfrentadas a los sustratos.

La "AP16 IF Plus" lava cada campo independientemente con un sistema de 2 cánulas. Una cánula dispensa un volumen definido de solución de lavado como gotas sobre el campo que va a lavarse, la otra aspira estas gotas de nuevo directamente a continuación. Esta operación se repite varias veces. Como alternativa está previsto un lavado continuo, es decir dispensado y aspiración simultáneas durante un espacio de tiempo definido. Ambas variantes encierran el peligro del contacto de cánula con el sustrato. Además este sistema consume innecesariamente mucha solución tampón de lavado, porque una gran parte del líquido de enjuague solo pasa por delante de los sustratos y no entra en contacto alguno con ellos - a diferencia de la invención, donde todo el volumen de lavado se conduce forzosamente a través de una hendidura delgada exactamente delante de los sustratos. Después de cada etapa de lavado en la "AP16 IF Plus" queda un volumen residual reseñable de solución tampón de lavado sobre el sustrato, entre otros, porque las cánulas de aspiración hacia el sustrato deben mantener una distancia de seguridad. Por ello el líquido de reactivo de manera incalculable se diluye, unas veces más, unas veces menos, lo cual repercute desventajosamente sobre la precisión de los análisis.

El procedimiento de lavado de la "Zenit SP Plus" asume conscientemente contaminaciones cruzadas: Cada portaobjetos se encuentra en un compartimiento de una fuente. Inicialmente se aspiran antes del lavado líquido de muestra o reactivo de los campos de reacción de cada portaobjetos con varias cánulas al mismo tiempo (barra de cánulas). A continuación todo el compartimiento se llena con solución de tampón de lavado, de modo que tiene lugar un lavado similar al de en una cubeta. (Este modo de proceder es peligroso: Algunos anticuerpos de título elevado y reactivos no se diluyen suficientemente mediante el primer llenado de lavado y pueden ocasionar bajo estas circunstancias en campos de reacción adyacentes reacciones falsamente positivas.) Finalmente el compartimiento con las cánulas se aspira de nuevo hasta vaciarse. También en este caso existe el riesgo de un daño de los cortes histológicos mediante las cánulas. Dado que toda la superficie del portaobjetos entra en contacto con líquido de lavado, queda más humedad residual sobre el portaobjetos, lo que favorece una confluencia incontrolada de las gotas aplicadas en la siguiente etapa de incubación de los campos de reacción adyacentes (después del contacto con una solución de proteína sérica se pierde la hidrofilia de un revestimiento de portaobjeto). También en este caso la solución de reactivo aplicado en la segunda etapa se diluye con demasiada intensidad mediante el líquido de lavado restante.

Por el contrario la presente invención hace posible un lavado automático con ahorro de líquido con una eficiencia y calidad elevadas, pero evita sin embargo los riesgos anteriormente mencionados de los dos aparatos sobre los que se ha tratado. El tipo de la disposición de los sustratos de fase sólida y su incubación en las acanaladuras del portarreactivo hace posible un lavado paralelo de los campos de una manera estrictamente independiente entre sí. En la alimentación y aspiración de la solución de lavado a través de las acanaladuras del portarreactivo las cánulas no reciben ningún contacto con los cortes histológicos. Además solo se humedecen las superficies de adhesión, y no la superficie restante del portaobjetos durante el lavado, lo que reduce el riesgo de la confluencia de los líquidos de campos adyacentes. El volumen residual de solución tampón de lavado tras la aspiración puede reducirse a un mínimo debido a la forma de la acanaladura, por ello la solución de reactivo no se diluye innecesariamente y con diferente intensidad de muestra a muestra como en las otras dos máquinas descritas del estado de la técnica.

Bibliografía

1. Stöcker W. Vorrichtung zur Durchführung von Mikroanalysen. (Dispositivo para llevar a cabo microanálisis). Patente europea EP 0 018 435 y patente estadounidense US 4 339 241 (1979).

2. Stöcker, W. **Verfahren und Vorrichtungen für Untersuchungen an unbeweglich gemachtem biologischem Material. (Procedimientos y dispositivos para exámenes en material biológico inmovilizado).** Patente europea EP 0 117 262 y patente estadounidense US 4 647 543 (1983).

3. Stöcker W, Scriba PC. Die Anwendung einer neuen, rationellen Immunfluoreszenztechnik in der klinischen

Routinediagnostik. In: Schatz, H., Doniach, D. (Hrsg.): Autoimmunität bei Schilddrüsenerkrankungen. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 157-174 (1984).

4. Stöcker W. Rationelle Histochemie mit einer neuen Mikroanalysemethode. Acta Histochem Suppl 31: 269-281 (1985).

5 5. Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Finkbeiner H, Stöcker K, Jantschek G, Scriba PC. Autoimmunity to pancreatic juice in Crohn's disease. Results of an autoantibody screening in patients with chronic inflammatory bowel diseases. Scand J Gastroenterol Suppl. 139:41-52 (1987).

10 6. Stöcker W, Rateike M, Morrin M. Verfahren zur Herstellung Festphasengebundener Bioreagenzien. (Procedimiento para la producción de biorreactivos enlazados a fase sólida). solicitud de patente europea PCT/EP/2005/000974 (2005).

7. Proost S, Schlumberger W, Meyer W, Dähnrich C, Müller-Kunert E, Sonnenberg K, Stöcker W. EUROPLUS - Eine BIOCHIP-Kombination aus Gewebeschnitten und Einzelantigenen für die indirekte Immunfluoreszenz: Endomysium /Gliadin, AMA/M2 y Parietalzellen/Intrinsic-Faktor. J Lab Med 20: 670 (1996).

15 8. Stöcker W, Poschmann A, Seitz C, Heise R, Hornof B, Böcker W. Rationelles Screening von Fusionsüberständen zum histochemischen Nachweis monoklonaler Antikörper gegen Tumor-assoziierte und andere Antigene. Verh Dtsch Ges Path 70: 393-395 (1986).

9. Meyer W, Scheper T, Lehmann H, Stöcker W. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Selbstklebende Blotmembranen. (Membranas de transferencia autoadhesivas). Modelo de utilidad alemán registrado DE 202 15 268.5 (2003).

20 10. Meyer W, Scheper T, Stöcker W. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Vorrichtung zur Antikörperdiagnose mit kombinierten Membranen. (Dispositivo para el diagnóstico de anticuerpos con membranas combinadas). Modelo de utilidad alemán registrado DE 202 15 270.7 (2003).

25 11. Pfeiffer T, Gruber R, Kuon W, Plischke H, Kirsch S, Körner D, Zieseniss S, Schattenkirchner M, Stöcker W, Steller U. Diagnostic microarray assay for SNP-typing of the gene encoding the drug metabolising enzyme arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2). Tagungshandbuch zum DECHEMA Statuseminar Chiptechnologien 90 (2007).

30 12. Steller U, Stöcker W. Verfahren zur Erzeugung perfekter Macro- und Microarrays durch Kombinieren vorselektierter beschichteter Festphasenfragmente (BMBF) (Procedimiento para generar macromatrices y micromatrices perfectas mediante combinación de fragmentos de fase sólida recubiertos preseleccionados). Solicitud de patente alemana y europea (documento de divulgación) DE 10 20006 027 517.9 y PCT/EP2007/004641 o WO2007140889 (2007).

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para llevar a cabo análisis inmunológicos, histoquímicos y citoquímicos, biomoleculares, enzimológicos, clínico-químicos y de otro tipo, que comprende
 5 un portaobjetos (1) con al menos dos superficies de adhesión longitudinales (2) y un sustrato de fase sólida fijado a las mismas, y
 un portarreactivo (5) con al menos dos acanaladuras longitudinales (6),
 estando previstos medios (11, 13, 14), para impedir el paso del líquido de una acanaladura a una acanaladura adyacente,
caracterizado porque
 10 están previstos medios, con cuya ayuda el portaobjetos (1) y el portarreactivo (5) en el estado unido están dispuestos en una posición definida el uno respecto al otro,
 el portaobjetos (1) puede unirse de manera separable al portarreactivo (5) de modo que cada una de las superficies de adhesión longitudinales (2) está enfrentada a cada una de las acanaladuras (6), y porque de esta manera puede disponerse sustrato de fase sólida sobre las superficies de adhesión longitudinales (2) y un líquido con reactantes
 15 disueltos en el mismo puede disponerse en las acanaladuras (6), porque el sustrato de fase sólida y los reactantes en el estado unido de portaobjetos (1) y portarreactivo (5) están en contacto, porque las acanaladuras de los portarreactivos tienen una longitud que llega más allá de los extremos longitudinales de las superficies de adhesión de los portaobjetos
 y porque los bordes de las acanaladuras se extienden hacia arriba en la parte que sobresale de las superficies de
 20 adhesión.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que entre superficies de adhesión adyacentes están previstas ranuras (4) o escalones que discurren en paralelo de un extremo longitudinal de la superficies de adhesión al otro.
3. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en el que las acanaladuras del portarreactivo discurren en salientes longitudinales dispuestos sobre la superficie de portarreactivo, estando separados unos de otros los salientes de acanaladuras adyacentes.
 25
4. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los bordes laterales de las acanaladuras terminan en punta arriba y se impide que el líquido en el estado unido de portaobjetos y portarreactivo salga hacia los lados de las acanaladuras.
5. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en el que las superficies internas de las acanaladuras están provistas de un perfil para guiar el líquido en las acanaladuras en dirección longitudinal.
 30
6. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en el que para aumentar la función de depósito para el líquido, con el fin de realizar la protección contra derramamiento, las acanaladuras de los portarreactivos tienen una longitud que llega más allá de los extremos longitudinales de las superficies de adhesión de los portaobjetos (10).
7. Dispositivo según la reivindicación 6, en el que los bordes de las acanaladuras se extienden hacia arriba en la parte que sobresale de las superficies de adhesión, para formar un depósito en forma de cuenco (13), que aloja líquido excedente.
 35
8. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en el que está previsto alrededor de cada superficie de adhesión del portaobjetos un borde circundante (8), que sobresale con respecto a la superficie de adhesión.
9. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en el que en la superficie de las acanaladuras están previstas placas de desviación, en las que en el caso de una inundación de líquido se forman remolinos en el líquido.
 40
10. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en el que sustratos de fase sólida están fijados en las superficies de adhesión con correactantes enlazados con ellos.
11. Dispositivo según la reivindicación 10, en el que los sustratos de fase sólida presentan material biológico, que está seleccionado de:
 45
 - a) cortes finos de tejidos biológicos,
 - b) frotis de células o grupos de células,
 - c) frotis de bacterias,
 - d) virus, protozoos y parásitos,
 - e) gotas de antígeno aplicadas en solución, endurecidas o acopladas,
 - 50 f) otras antígenos acoplados a una superficie y/o
 - g) secuencias de nucleótidos discrecionales.
12. Procedimiento para llevar a cabo análisis inmunológicos, histoquímicos y citoquímicos, biomoleculares, enzimológicos, clínico-químicos y de otro tipo, **caracterizado porque** se emplea un dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 11.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que una mezcla continua de cada fórmula de análisis individual se alcanza al hacerse pivotar periódicamente el portarreactivo, junto con el portaobjetos situado sobre el mismo, en dirección longitudinal de las acanaladuras desde la horizontal hasta que el líquido fluye en vaivén de un extremo a otro.

- 5 14. Procedimiento según la reivindicación 12 o reivindicación 13, en el que se alcanza una mezcla del líquido en cada acanaladura al ser el volumen de líquido movido en cada mitad de ciclo de un extremo longitudinal de las acanaladuras de portarreactivo hacia el otro extremo mayor que el volumen de líquido por debajo de las superficies de adhesión, por lo que el líquido en ambos extremos de cada acanaladura queda incluido en la mezcla.

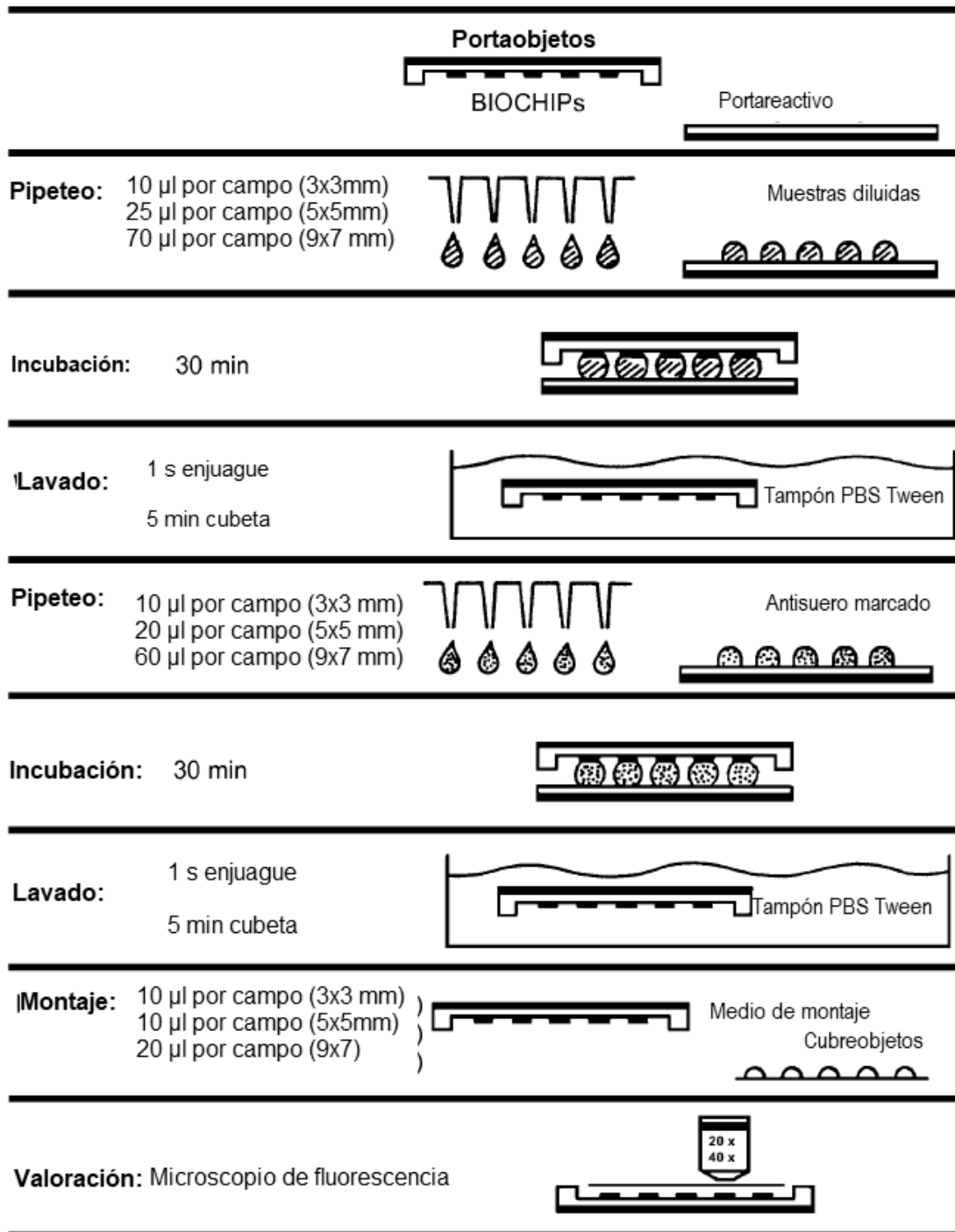


Figura 1

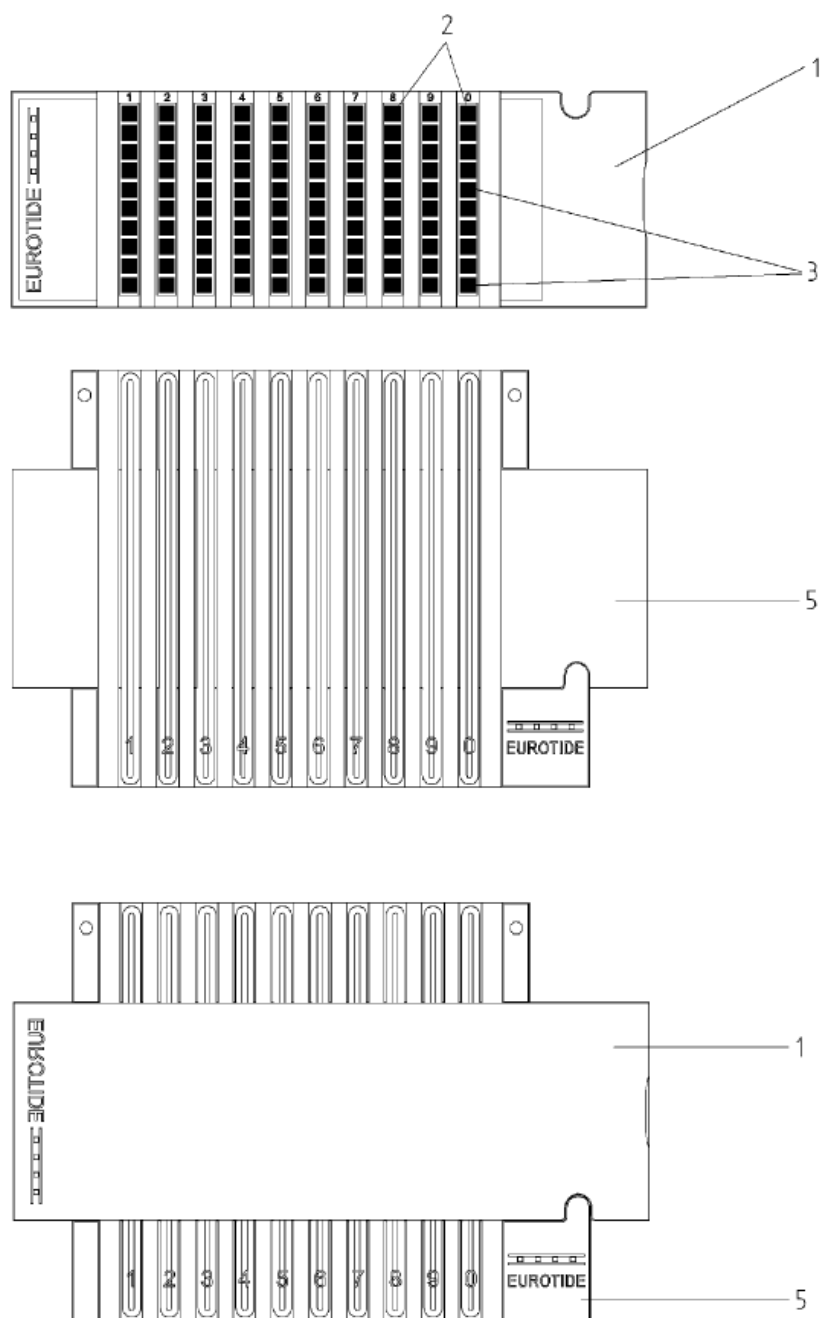


Figura 2

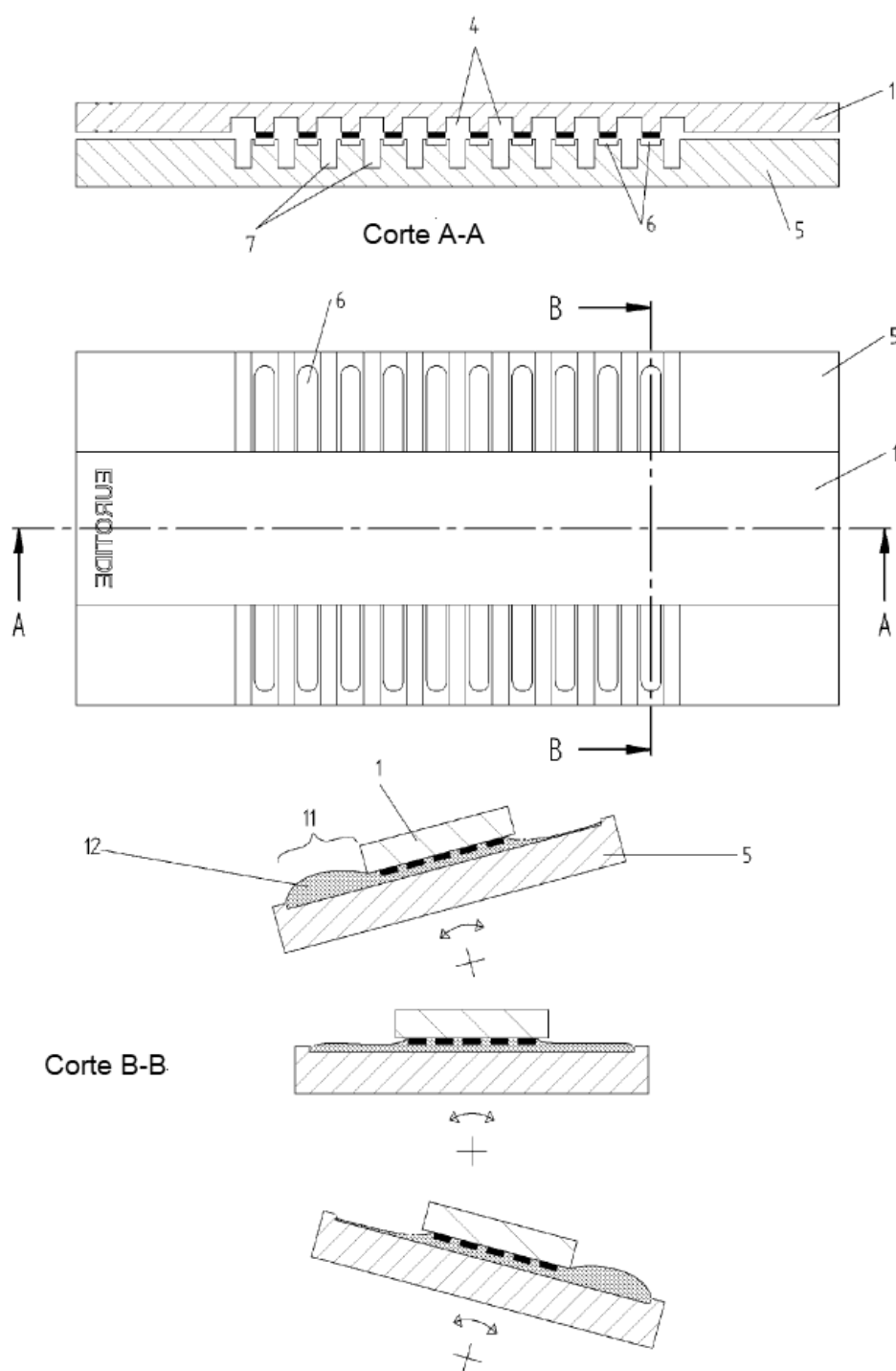


Figura 3

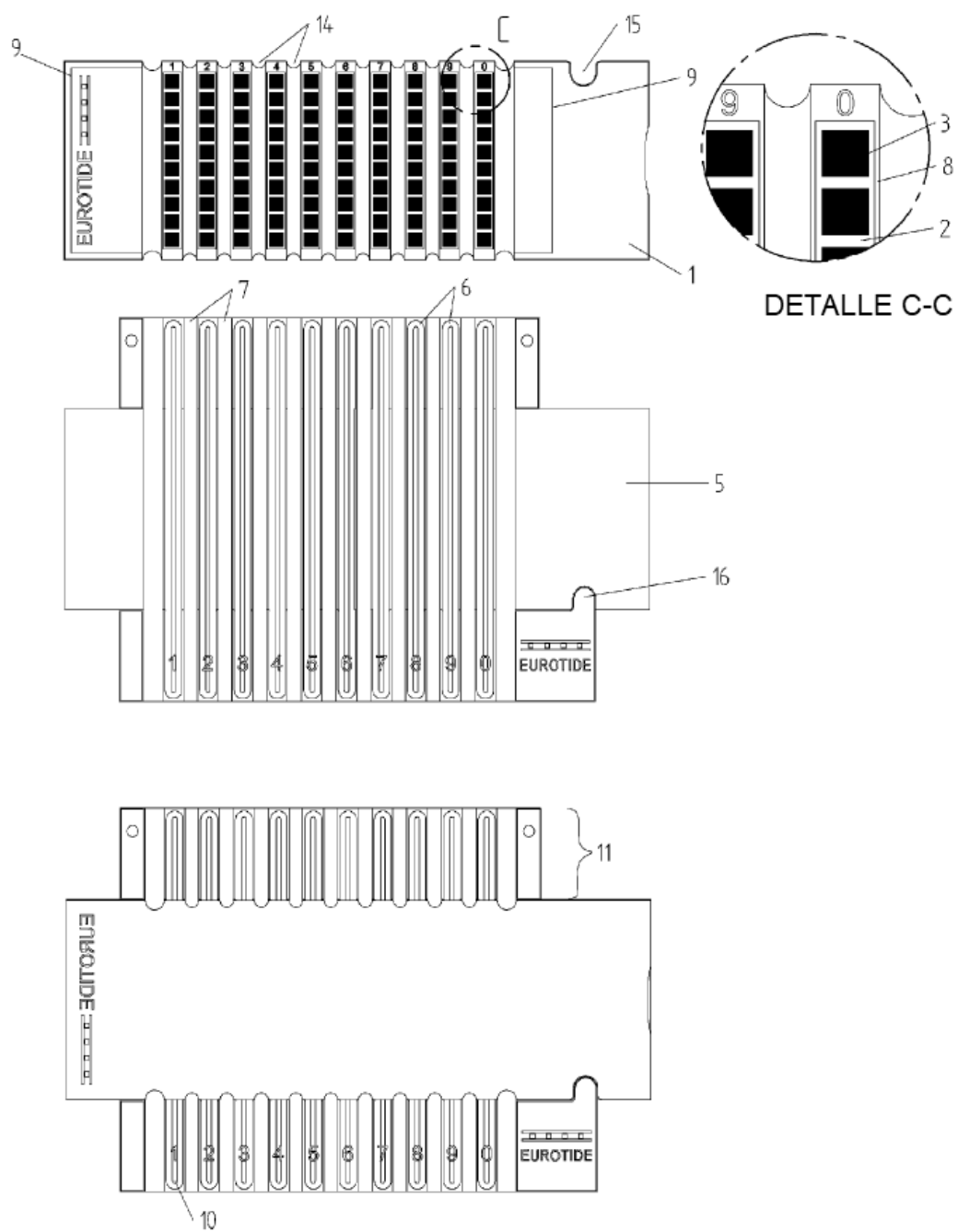
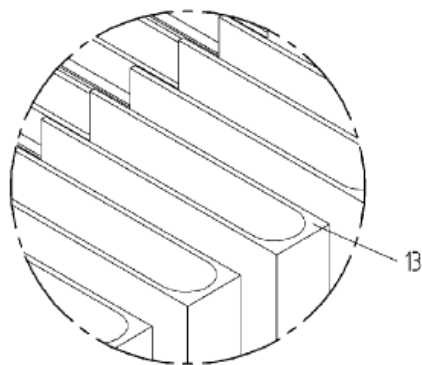
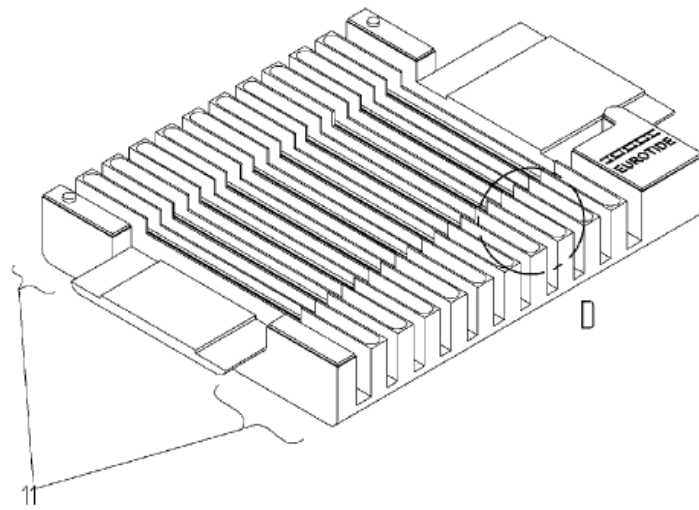


Figura 4



·DETALLE D

Figura 5