

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 713**

51 Int. Cl.:

G01N 1/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2014 PCT/US2014/033032**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14165796**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2014 E 14727658 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2981801**

54 Título: **Sistemas y procedimientos automatizados para preparar muestras biológicas para su examen**

30 Prioridad:

05.04.2013 US 201361809179 P

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

22.07.2020

73 Titular/es:

**ROCHE DIAGNOSTICS HEMATOLOGY, INC.
(100.0%)
9115 Hague Rd.
Indianapolis IN 46250, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 774 713 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

Sistemas y procedimientos automatizados para preparar muestras biológicas para su examen

5 ANTECEDENTES

5 Durante años, los auxiliares de laboratorio han usado tintes y colorantes tales como los usados en la tinción de Romanowsky para preparar muestras biológicas para mejorar el contraste de una muestra durante su examen. Dicho examen utiliza típicamente un microscopio, otro dispositivo que capta imágenes de la muestra o, en otros casos, un examen visual sin ayuda. Se conocen varios sistemas y procedimientos diferentes para preparar una muestra para su 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 de EE. UU. n.º 2008/0102006 y 2006/0073074 publicadas se refieren a máquinas y procedimientos para teñir un sustrato durante el procesamiento de muestras. Estas publicaciones proporcionan diversos detalles sobre la tinción y la preparación de muestras para su examen.

15 El documento WO 2012/064873 A1 divulga sistemas y procedimientos que permiten la preparación automatizada de muestras biológicas para su examen, en los que se realiza un ciclo de agitación moviendo mecánicamente un sustrato de muestra con respecto a una plataforma, entre los cuales hay fluidos presentes. Como tal, al alterar la separación existente entre el sustrato y la plataforma, se logra la redistribución de los fluidos.

20 El documento WO 2007/137272 A2 divulga un dispositivo, procedimiento y sistema para preparar y almacenar muestras para su análisis microscópico.

25 El documento EP 0 310 399 A2 divulga un procedimiento de procesamiento de tejidos o similares que implica la aplicación de líquidos al material montado en un soporte.

SUMARIO

30 La presente divulgación se refiere a sistemas y procedimientos automatizados para preparar muestras biológicas para su examen. Las muestras pueden incluir, por ejemplo, una muestra de sangre que contiene glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, aplicada a un sustrato, por ejemplo, un portaobjetos de microscopio o un cubreobjetos. Se pueden usar diferentes modos 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. Otros aspectos adicionales de la divulgación incluyen sistemas y procedimientos para fijar, teñir, enjuagar y agitar las muestras. En general, los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento proporcionan un procesamiento de muestras rápido, eficaz y altamente uniforme usando cantidades mínimas de fluido. Los procedimientos incluyen una o más fases de fijación, tinción y enjuague, incluyendo una o múltiples fases de agitación durante o después de una o más de las fases de fijación, tinción y enjuague. Los sistemas se pueden aplicar como un dispositivo autónomo o como un componente en un sistema mayor para preparar y examinar muestras biológicas.

40 En general, en un primer aspecto, la divulgación cuenta con un aparato para preparar una muestra biológica en un sustrato para su examen, incluyendo el aparato: (a) un brazo del sustrato que incluye un portador del sustrato; (b) un primer accionador conectado al brazo del sustrato y configurado para mover el brazo del sustrato entre una posición abierta y una posición de procesamiento de muestras; (c) un segundo accionador dispuesto y configurado para agitar un sustrato sujeto por el portador del sustrato al brazo del sustrato; (d) una plataforma que tiene una superficie superior ubicada opuesta al sustrato cuando el brazo del sustrato está en la posición de procesamiento de muestras; y (e) dos o más vástagos dispuestos en la superficie superior de la plataforma de modo que cuando el sustrato se pone en contacto con todos los vástagos en la posición de procesamiento del sustrato, el sustrato y la superficie superior de la plataforma están sustancialmente paralelos y forman una separación de al menos aproximadamente 50 micrómetros. El aparato de acuerdo con la invención comprende otras características como se define en la reivindicación 1 adjunta.

50 Los modos de realización del aparato pueden incluir una o más de las siguientes características individualmente o en combinación.

55 El primer y el segundo accionador pueden ser el mismo accionador configurado para mover el brazo del sustrato y para agitar un sustrato sujeto por el portador del sustrato al brazo del sustrato. Una superficie total de la superficie superior de la plataforma puede ser más pequeña que una superficie total del sustrato. Puede haber al menos tres o más vástagos dispuestos en los bordes exteriores de la superficie superior de la plataforma, donde las puntas de los vástagos definen un plano.

60 Se puede colocar un puerto de succión en el portador del sustrato; el puerto de succión se puede conectar a una fuente de succión para proporcionar succión al puerto de succión a través de un tubo de succión, para sostener de este modo el sustrato en el portador del sustrato. El aparato puede incluir un primer puerto de colorante situado en la superficie superior de la plataforma, un primer depósito de colorante y un primer conducto de colorante conectado al primer puerto de colorante para proporcionar una vía de fluido para bombear colorante desde el primer depósito de colorante al primer puerto de colorante y a la separación. El aparato puede incluir un segundo puerto de colorante

- 5 situado en la superficie superior de la plataforma en una ubicación diferente de la ubicación del primer puerto de colorante, un segundo depósito de colorante y un segundo conducto de colorante, donde el primer y segundo puertos de colorante están dispuestos en la superficie superior a una distancia de una zona de muestras del sustrato cuando el sustrato está en la posición de procesamiento de muestras, y donde el segundo conducto de colorante está conectado al segundo puerto de colorante para proporcionar una vía de fluido para bombear el colorante desde el segundo depósito de colorante al segundo puerto de colorante y a la separación.
- 10 El aparato puede incluir un primer puerto de fijador situado en la superficie superior de la plataforma, un depósito de fijador y un conducto de fijador conectado al primer puerto de fijador para proporcionar una vía de fluido para bombear fijador desde el depósito de fijador al primer puerto de fijador y a la separación. El aparato puede incluir un primer puerto de enjuague ubicada en la superficie superior de la plataforma, un depósito de solución de enjuague y un tubo de enjuague conectado al primer puerto de enjuague para proporcionar una vía de fluido para bombear fluido de enjuague desde el depósito de solución de enjuague al primer puerto de enjuague y a la separación.
- 15 El aparato puede incluir un primer puerto de vacío ubicado en la superficie superior de la plataforma, un primer recipiente de residuos y un primer conducto de residuos conectado al primer puerto de vacío para proporcionar una vía de presión negativa para evacuar fluido de la separación o del sustrato y depositar el fluido en el primer recipiente de residuos. El aparato puede incluir un segundo puerto de vacío ubicado en la superficie superior de la plataforma y un segundo conducto de residuos conectado al segundo puerto de vacío para proporcionar una vía de presión negativa para evacuar fluido de la separación o del sustrato y depositar el fluido en el primer recipiente de residuos. El primer y segundo puertos de vacío pueden estar ubicados en extremos opuestos de la superficie superior de la plataforma.
- 20 La plataforma puede incluir: un puerto fijador, un primer puerto de colorante, un segundo puerto de colorante, un puerto de enjuague, un primer puerto de vacío y un segundo puerto de vacío. El aparato puede incluir un bloque dispuesto para sostener la plataforma, donde el bloque incluye: un puerto de fijador, un primer puerto de colorante, un segundo puerto de colorante, un puerto de enjuague, un primer puerto de vacío y un segundo puerto de vacío, donde cada puerto en el bloque está en una ubicación correspondiente a un puerto ubicado en la plataforma.
- 25 El aparato puede incluir: un primer depósito de colorante, un segundo depósito de colorante, un depósito de fijador, un depósito de solución de enjuague, un recipiente de residuos, una bomba una pluralidad de conductos hidráulicos conectados a la bomba y a los depósitos y dispuestos para dosificar fluido desde uno o más de los depósitos y una fuente de vacío para evacuar fluido del sustrato al recipiente de residuos. El aparato puede incluir un secador situado para dirigir un flujo de aire a lo largo de la muestra cuando el sustrato está ubicado en la posición abierta.
- 30 Los modos de realización del aparato también pueden incluir cualquiera de las otras características, y cualquier combinación de características, divulgadas en el presente documento, según corresponda.
- 35 En otro aspecto, la divulgación cuenta con procedimientos para preparar una muestra biológica en un sustrato para su examen, incluyendo los procedimientos: (a) situar el sustrato con respecto a una superficie de modo que la muestra biológica se oriente hacia la superficie, y de modo que el sustrato y la superficie estén sustancialmente paralelos y formen una separación de al menos aproximadamente 50 micrómetros; (b) dosificar secuencialmente una primera cantidad de (i) una primera solución fijadora, (ii) una primera solución de colorante, (iii) una segunda solución de colorante y (iv) una primera solución de enjuague a la separación entre el sustrato y la superficie en cantidad suficiente para llenar la separación; y (c) después de dosificar la primera cantidad de cada una de las soluciones (i), (ii), (iii) y (iv) en la etapa (b), y antes de dosificar la siguiente de las soluciones (i), (ii), (iii) y (iv) en la etapa (b), dosificar una cantidad adicional de la solución a la separación para desplazar una parte de la primera cantidad de la solución, y retirar la parte de la primera cantidad de la solución a través de un puerto de vacío. El procedimiento de acuerdo con la invención comprende otras características como se define en la reivindicación 13 adjunta.
- 40 Los modos de realización de los procedimientos pueden incluir una o más de las siguientes características.
- 45 Los procedimientos pueden incluir dosificar múltiples cantidades adicionales de la solución a la separación para desplazar partes de solución de la separación, y retirar las partes de solución desplazadas a través del puerto de vacío.
- 50 Las múltiples cantidades adicionales de la solución pueden incluir al menos 2 cantidades adicionales de la solución (por ejemplo, al menos 4 cantidades adicionales de la solución). Los procedimientos pueden incluir dosificar la cantidad adicional de la solución a la separación a un caudal de 20 microlitros por segundo o más. Los procedimientos pueden incluir dosificar la cantidad adicional de la solución a la separación a un caudal de 250 microlitros por segundo o menos. Las etapas (a), (b) y (c) se pueden realizar en un tiempo total inferior a 60 segundos.
- 55 Las formas de realización de los procedimientos también pueden incluir cualquiera de los otras etapas o características divulgadas en el presente documento, incluyendo las etapas y características divulgadas en relación con diferentes modos de realización, en cualquier combinación según corresponda.
- 60 A menos que se establezca expresamente de otro modo, la presente divulgación cuenta con una serie de modos de realización con propósitos ilustrativos. Sin embargo, cabe destacar que las características, aspectos y etapas
- 65

5 asociados con cada uno de estos modos de realización se pueden combinar con características, aspectos y etapas asociados con otros modos de realización. El alcance de la divulgación no está limitado a las combinaciones particulares de características, aspectos y etapas divulgados en relación con modos de realización específicos, sino que se debe entender que dichas características, aspectos y etapas son aplicables más en general a toda la divulgación, y se pueden combinar del modo deseado en modos de realización específicos adicionales.

10 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la presente invención, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

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

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La FIG. 1 es una vista en perspectiva de un modo de realización de un aparato para preparar muestras biológicas para su examen, con ambos portamuestras 20A y 20B en posición abierta.

La FIG. 2 es otra vista en perspectiva de una parte del aparato de la fig. 1 (no se muestran los brazos del sustrato ni los portamuestras).

25 La FIG. 3A es otra vista en perspectiva del aparato de la fig. 1, con el portamuestras 20A en posición abierta y el portamuestras 20B en posición cerrada (de procesamiento de muestras).

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

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

35 La FIG. 5 es una vista en perspectiva de un sistema de examen de muestras que incluye un transportador del sustrato automatizado y un modo de realización de un aparato de preparación de muestras como se describe en el presente documento.

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

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

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

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

La FIG. 7B es un diagrama esquemático de un modo de realización de un aparato de preparación de muestras como se describe en el presente documento.

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

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

55 La FIG. 9 es un diagrama de flujo que muestra una serie de etapas para aplicar fijador a una muestra.

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

60 La FIG. 11A es un diagrama de flujo que muestra una serie de etapas para retirar el exceso de fluido de un sustrato.

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

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

5 La FIG. 15 es una vista en perspectiva de un aparato de preparación de muestras como se usa en un sistema de examen de muestras más grande.

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

10 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.

15 Las FIGS. 18A y 18B son vistas en perspectiva del aparato de la fig. 1 que muestran la colocación de un sustrato sobre un brazo del sustrato por un transportador del sustrato automatizado.

Los símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 En el presente documento se divulgan procedimientos y sistemas para el procesamiento automatizado de muestras biológicas. Los procedimientos y sistemas de procesamiento automatizado de muestras descritos en el presente documento proporcionan ventajas sobre los procedimientos manuales y otros procedimientos automatizados de procesamiento, que incluyen una velocidad de procesamiento potenciada mientras se usan volúmenes mínimos de reactivos y al mismo tiempo producen una preparación de muestra altamente uniforme que reduce significativamente la variabilidad asociada con la aplicación de colorantes, fijadores y otros reactivos en comparación con las muestras procesadas a mano o por otros sistemas.

30 Los procedimientos convencionales de procesamiento automatizado tienen típicamente 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. Sin embargo, para muchas aplicaciones, son deseables tanto el funcionamiento de alto rendimiento como el bajo consumo de fluidos. Manteniendo un alto rendimiento, las muestras se pueden procesar eficazmente para su posterior examen. Manteniendo bajo el consumo de fluidos, la cantidad de residuos del procesamiento se reduce junto con el volumen necesario de reactivos de procesamiento, manteniendo bajos los costes de funcionamiento. Los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento permiten el procesamiento automatizado rápido de muestras (por ejemplo, más de 100 muestras por hora por una sola máquina) usando bajos volúmenes de fluidos de procesamiento (por ejemplo, menos de 1 ml de fluidos por muestra), mientras producen resultados altamente uniformes y repetibles.

Sistemas y procedimientos de preparación de muestras biológicas

45 Antes de examinar las muestras, se preparan en una serie de etapas para potenciar el aspecto visual de determinadas características en las muestras. En la FIG. 1 se ilustra un modo de realización de un aparato o máquina 1 para preparar una muestra biológica para su examen o formación de imágenes en un sustrato 2 tal como un portaobjetos de microscopio, cubreobjetos u otra superficie transparente. La máquina 1 se puede incorporar a un sistema global para preparar y analizar muestras que comprenden fluidos corporales u otras muestras biológicas que contienen células, tal como el sistema 2000 que se muestra en la fig. 15 y se describe a continuación. La máquina 1 generalmente puede incluir un sistema, o formar parte del mismo, con una primera estación que obtiene una muestra, una segunda estación que aplica la muestra a un sustrato, tercera y cuarta estaciones para fijar y teñir la muestra, respectivamente, una quinta estación que seca la muestra, una sexta estación que toma imágenes de la muestra y una séptima estación para analizar las imágenes y los datos obtenidos de la muestra. Determinados modos de realización de la máquina 1 son compatibles con el sistema 2000; algunos modos de realización de la máquina 1 se pueden usar en otros sistemas de preparación de muestras y/o como dispositivos autónomos.

55 La máquina 1 puede incluir un sistema de control 5 o se puede conectar al mismo, como 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 de los cuales contiene una unidad central de procesamiento que puede ejecutar instrucciones de programas informáticos almacenados en medios legibles por ordenador tales como un disco duro, unidad óptica o memoria. Adicionalmente, el sistema de control 5 puede incluir circuitos eléctricos para ejecutar las instrucciones de los programas informáticos. El sistema de control 5 puede incluir una interfaz de usuario para recibir comandos del usuario para controlar el funcionamiento de la máquina 1. Los programas informáticos almacenados en el ordenador o proporcionados al mismo puede incluir programas que controlan el funcionamiento de los componentes de la máquina 1 durante el procesamiento de muestras, tales como las bombas de fluidos y el vacío. Por ejemplo, los programas informáticos pueden incluir instrucciones para ordenar a la máquina 1 que aplique diversos fijadores, colorantes y enjuagues a la muestra, y que realice varias etapas de agitación durante el procesamiento de muestras.

Además, los programas informáticos pueden incluir configuraciones predeterminadas, y la interfaz de usuario puede contener características de personalización para proporcionar al usuario la capacidad de 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 enjuague, así como los parámetros de agitación (que se describen adicionalmente a continuación). El sistema de control 5 también se puede comunicar por medio de un protocolo de red (tal como Appletalk®, IPX o TCP/IP). Por ejemplo, el protocolo de red puede usar cables (tales como cables de par trenzado) y/o una conexión inalámbrica tal como WiFi. El sistema de control puede estar conectado a un sistema de información del laboratorio usando el protocolo de red. El sistema de información del 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 proporciona información sobre la persona o la fuente de la muestra (por ejemplo, nombre, fecha de nacimiento (FN), dirección, hora en que se tomó la muestra, sexo, etc.), información relacionada con el procesamiento de la muestra (procesada en fecha ####/####/####, número de muestra #, etc.), una copia de las imágenes adquiridas de la muestra y copias de los resultados obtenidos al analizar las imágenes.

En referencia a la fig. 1, la máquina 1 puede incluir soportes 110A y 110B para sujetar el dispositivo a una ubicación dentro de un sistema o a una estación de trabajo de laboratorio. La máquina 1 también incluye uno o más brazos del sustrato 10A y 10B, cada uno conectado por la base a un accionador 30A y 30B. Los extremos opuestos de los brazos del sustrato 10A y 10B incluyen portadores de sustrato 20A y 20B para recibir y sostener sustratos durante el procesamiento de muestras. Cada portador del sustrato 20A y 20B recibe y sostiene un sustrato 2 mientras la máquina 1 completa todas las etapas de procesamiento de muestras (descritos a continuación). El sustrato puede ser o incluir un portaobjetos de microscopio, un cubreobjetos u otro material transparente adecuado para sostener una muestra durante el procesamiento de la muestra y su examen microscópico después del procesamiento de la muestra. El modo de realización de la fig. 1 representa un portaobjetos de microscopio de vidrio, sustrato 2, que incluye una muestra biológica 3. Usando puertos de succión, los portadores de sustrato 20A, 20B pueden sostener el sustrato 2 en los brazos del sustrato 10A, 10B durante el procesamiento de la muestra. Un tubo de succión 23 proporciona succión a los portadores de sustrato 20A y 20B a través de los puertos de succión 21A y 21B, y 22A y 22B (cabe señalar que los puertos 21A y 22A están situadas detrás del portaobjetos 2 en la fig. 1, y se muestran en líneas discontinuas).

El modo de realización de la máquina 1 mostrada en las figs. 1-3 es una máquina de doble sustrato, que puede sostener y procesar un sustrato en cada uno de los brazos del sustrato 10A y 10B. Otros modos de realización proporcionan el procesamiento de un solo sustrato o tres o más sustratos, secuencial o simultáneamente. Además, mientras que los modos de realización representados en las figs. 1-6 usan succión para sujetar los sustratos 2 a los brazos del sustrato 10A y 10B, otros modos de realización alternativos pueden usar diversos tipos de pinzas, lengüetas o imanes (si el sustrato está magnetizado) para sujetar un sustrato 2 a un brazo del sustrato 10A durante el procesamiento de muestras.

En los modos de realización que se muestran en las figs. 5 y 18A-B, la máquina 1 recibe un sustrato 2 que lleva una muestra 3 de un transportador del sustrato automatizado 120 o manualmente de una persona. Como ejemplo, el transportador del 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). En la FIG. 5 se muestra un sistema que tiene una primera estación lectora de etiquetas 121, una estación de aplicación 122, una estación de tinción 123 que incluye la máquina 1, una cámara o estación de imágenes 124 y una segunda estación lectora de etiquetas 125. La primera estación lectora de etiquetas 121 está configurada para leer información del sustrato 2 tal como un código de barras y/o información de "huellas" que se usa para identificar el sustrato 2 concreto y la muestra 3 sobre el mismo. La segunda estación lectora de etiquetas 125 funciona de la misma manera, y la información que lee se usa para verificar que la muestra 3 de la que se obtienen imágenes en la estación 124 es la misma que el sustrato que se procesó.

El transportador del sustrato 120 puede incluir un portador 127 para sostener el sustrato 2 y un circuito de registro o programa informático para permitir que el transportador 120 determine si el sustrato 2 está montado en el transportador 120. En un modo de realización, el transportador del sustrato 120 puede incluir un cilindro hidráulico para transportar el sustrato 2 desde una primera estación 121 hasta una segunda estación 122. Después del procesamiento de la muestra, el transportador del 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 la estación 124. De forma alternativa, una persona puede retirar manualmente un sustrato de la máquina 1 después del procesamiento de la muestra.

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

Cabe señalar que la máquina 1 de la fig. 1 está configurada para aceptar y examinar dos sustratos. En el siguiente análisis y figuras se puede hacer referencia a un solo conjunto de componentes de la máquina 1 (por ejemplo, portador del sustrato 20A, accionador 30A, brazo del sustrato 10A, etc.). Sin embargo, se debe entender que las mismas etapas, características y atributos que se divulgan en relación con un conjunto de componentes también se pueden aplicar al otro conjunto de componentes de la máquina 1 (por ejemplo, portador del sustrato 20B, accionador 30B, brazo del sustrato 10B, etc.). Por tanto, aunque el análisis en el presente documento se centra solo en un conjunto de componentes para mayor claridad y brevedad, se entiende que las máquinas para el examen de muestras, tal como la máquina 1, pueden incluir dos o más de dos conjuntos de componentes, teniendo cada conjunto algunas o todas las características analizadas en el presente documento.

Volviendo a las figs. 7A y 7B, en una primera etapa 502 del diagrama de flujo 500, el transportador del sustrato 120 pone un sustrato 2 en contacto con un portador del sustrato 20A. En la etapa 504, el sustrato 2 se sitúa sobre el portador del sustrato en una posición de "muestra arriba" o "abierta". A continuación, en la etapa 506, el accionador 30A gira el brazo del sustrato 10A aproximadamente 180° (véase la fig. 7B) para situar el sustrato 2 en una posición de "muestra abajo" o "procesamiento de muestras" o "cerrada" (etapa 508), directamente sobre la plataforma 60A, de modo que el sustrato 2 esté en una posición de procesamiento en la etapa 510.

A continuación, en la etapa 512, la máquina 1 tiñe la muestra 3 situada sobre el sustrato 2 dirigiendo fluidos adecuados, incluyendo colorantes, fluidos de lavado y fijadores, que se bombean desde los depósitos 210A, 211A, 212A y 213A, para que entren en contacto con la muestra 3 a través de los puertos 42A, 43A, 44A y 45A. El exceso de fluidos se retira de la muestra 3 mediante bombeo de vacío a través de los puertos 40A y 41A, y se recoge en los colectores de residuos 230 y 231.

En la etapa 514, después de la tinción de la muestra 3, el accionador 30A gira el brazo del sustrato 10 aproximadamente 180° (invirtiendo la rotación de la etapa 506) para devolver el sustrato a la posición de "muestra arriba". Finalmente, en la etapa 516, el transportador del sustrato 120 retira el sustrato procesado del portador del sustrato 20A. También se pueden usar otras posiciones abiertas o de "muestra arriba", siempre que un operario o un transportador del sustrato automatizado puedan cargar y descargar sustratos de la máquina 1. Por ejemplo, la posición de muestra arriba se puede girar 100° o más (por ejemplo, 120° o más, 130° o más, 140° o más) desde la posición de procesamiento de muestras. En algunos modos de realización, la posición de muestra arriba se puede girar menos de 100° (por ejemplo, menos de 90°, menos de 80°, menos de 70°) desde la posición de procesamiento de muestras, siempre que un operario o un transportador del sustrato puedan cargar y descargar sustratos de la máquina 1.

Los accionadores 30A y/o 30B pueden incluir un motor eléctrico, un sistema neumático, sistemas magnéticos u otro equipo informático (por ejemplo, un engranaje helicoidal) para mover el brazo 10A y/o 10B. Cuando los brazos del sustrato 10A y 10B están en posición abierta como se representa en la fig. 1, los portadores 20A y 20B pueden recibir cada uno un sustrato 2. Una vez cargados sobre un portador del sustrato 20A o 20B, a continuación los accionadores 30A y/o 30B giran los brazos 10A y/o 10B, y por tanto el sustrato 2, desde la posición abierta ("muestra arriba") hasta una posición de procesamiento ("muestra abajo", como se muestra para el brazo 10B en la fig. 3A) para la aplicación de soluciones de fijador, colorante y enjuague, incluyendo etapas de agitación, y de vuelta a una posición abierta para descargar después del procesamiento.

Con referencia a la fig. 3A, el accionador 30B ha girado el brazo del sustrato 10B desde la posición abierta representada en la fig. 1 a una posición "cerrada" o de procesamiento. En la FIG. 3A se muestra que el sustrato 2 en el brazo del sustrato 10B se ha volteado y girado aproximadamente 180° desde su posición de carga mostrada en la fig. 1 hasta una posición orientada hacia abajo donde la muestra 3 sobre el sustrato 2 está sustancialmente paralela a la superficie de la plataforma 60B. Como se analiza en relación con la fig. 7A anterior, mientras el sustrato 2 se sitúa próximo a la plataforma 60B en la posición de procesamiento de muestras que se muestra, la máquina 1 aplica diversos fijadores, colorantes y enjuagues 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 accionador 30B gira el brazo del sustrato 10B de vuelta a la posición abierta que se muestra en la fig. 1 (ambos brazos) y en la fig. 3A (donde solo el brazo 10A está en la posición abierta).

En determinados modos 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 (como se muestra en las figs. 1 y 3). Los sensores 105A y 105B pueden ser sensores de proximidad, por ejemplo, sensores fotoeléctricos, que utilizan, por ejemplo, luz infrarroja o diversas otras tecnologías (láser, 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 un brazo del sustrato (por ejemplo, el brazo 10A y/o 10B) o un portador del sustrato (por ejemplo, el portador 20A y/o 20B) están dentro del campo de detección. El sistema de control 5 puede recibir información de los sensores para determinar la posición de los brazos del sustrato 10. Por ejemplo, cuando el brazo del 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 el portador del sustrato diana 20B y notifica al sistema de control 5 que el brazo del sustrato 10B está girado a una posición de procesamiento de muestras. En esta posición, el sensor de proximidad 105B en el extremo distal del brazo indicador 101B no enviará una señal al sistema de control 5, porque el sensor no detecta ninguna diana (por ejemplo, un brazo del sustrato o un portador del sustrato).

5 Cuando el brazo del sustrato 10B gira a una posición abierta (como se muestra en la fig. 1), el sensor de proximidad 105B en el extremo distal del brazo indicador 101B detecta el portador del sustrato 20B y notifica al sistema de control 5 que el brazo del sustrato 10B está girado a una posición abierta. Dicho de otra manera, cuando el brazo del sustrato 10B ha girado alejándose del sensor 105B, los sensores envían una señal de "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 de "presente" al sistema de control 5. En configuraciones alternativas, el sensor puede estar montado en el sustrato 10B y puede detectar la presencia del brazo indicador 101B. En algunos modos de realización, el sistema de control 5 se puede usar para calibrar la posición de los accionadores 30A y 30B en posiciones conocidas abierta y de procesamiento de muestras, y/o para controlar activamente el movimiento y la posición de los brazos del sustrato 10A y 10B basándose en las señales de control y/o en la retroalimentación recibida de los accionadores 30A y 30B.

15 La estructura y el eje de rotación de los brazos del sustrato 10A y 10B de la fig. 1 se pueden variar en otros modos de realización de la invención. En la FIG. 8A se muestra un diagrama de flujo 600 que incluye una serie alternativa de etapas para mover los brazos del sustrato desde una posición abierta hasta una posición de procesamiento. El diagrama de flujo 600 se describe adicionalmente a continuación con referencia a la fig. 8 B, que muestra un diagrama esquemático de la máquina 1.

20 En la etapa 602 del diagrama de flujo 600, el transportador del sustrato 120 coloca el sustrato 2 en el portador del sustrato 20A en una orientación de "muestra arriba". A continuación, en la etapa 604, un primer accionador 30A gira el sustrato 2 aproximadamente 180° en un plano perpendicular al plano de la fig. 8B, de modo que el sustrato 2 permanece orientado en posición de "muestra arriba" encima de la plataforma 60A. En la etapa 606, un segundo accionador 35A recibe el sustrato 2 orientado en la posición de "muestra arriba". A continuación, en la etapa 608, el segundo accionador 35A (por ejemplo, situado entre el brazo del sustrato 10A y el portador del sustrato 20A) gira el sustrato 2 a una orientación de "muestra abajo". El segundo accionador 35A también puede mover el sustrato 2 hacia abajo hacia la plataforma 60A de modo que el sustrato 2 se ponga en contacto con los vástagos 70A y 70B.

30 A continuación, con el sustrato 2 en la posición de procesamiento en la etapa 610, la máquina 1 tiñe la muestra 3 sobre el sustrato 2 aplicando colorantes, fijadores y soluciones de lavado como se analiza anteriormente en relación con la etapa 512 del diagrama de flujo 500. Una vez completada la tinción, el segundo accionador 35A gira el sustrato 2 desde una orientación de "muestra abajo" hasta una orientación de "muestra arriba" (etapa 614), y a continuación el primer accionador 30A gira 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 modo que el sustrato permanezca orientado en posición de "muestra arriba". Finalmente, en la etapa 618, el transportador del sustrato 120 retira el sustrato procesado del portador del sustrato 20A.

40 En general, la máquina 1 puede incluir una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco) plataformas 60A y 60B como se muestra en las figs. 1-3 para el procesamiento de muestras. Como se muestra en la fig. 2, la plataforma 60A puede incluir laterales para sostener un lado superior de la plataforma. Un escudo 100, que se muestra en las figs. 1 y 3, se puede situar entre las plataformas 60A y 60B para evitar que salpiquen fluidos entre las plataformas 60. En algunos modos 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 la otra plataforma. En determinados modos de realización, el escudo 100 se puede formar a partir de un material que es translúcido u opaco. En las figs. 1 y 3, el escudo 100 se representa como formado a partir de un material transparente para permitir que otros componentes situados 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 partes de algunos componentes tales como la plataforma 60A y el bloque 80A se habrían ocultado.

50 La FIG. 3B muestra un mecanismo de indexación 50A que se puede usar para trasladar la máquina 1 para proporcionar sustratos 2 de cada uno de los portadores de sustrato 20A, 20B a una posición para el procesamiento de muestras. El mecanismo de indexación 50A puede tener muchas formas, tales como dispositivos electromecánicos (por ejemplo, un conjunto de engranajes de piñón y cremallera accionado por un motor eléctrico), accionadores lineales (por ejemplo, accionadores neumáticos, accionadores hidráulicos o accionadores electromagnéticos). Aunque, en el modo de realización ilustrado, el mecanismo de indexación 50A traslada la máquina 1 linealmente entre dos posiciones, son posibles otras trayectorias de traslado basándose en el número de plataformas incluidas en la máquina 1, y en su configuración y disposición, tales como circular o semicircular (por ejemplo, una mesa de indexación que se puede mover en una trayectoria arqueada). Como se muestra, el mecanismo de indexación 50A puede incluir un engranaje de cremallera 50B sujeto a una base 50C de la máquina 1 y un engranaje de piñón 50D conectado a un motor eléctrico 50E que está fijado a la base 50C. La máquina 1 se puede conectar a la base 50C usando uno o más dispositivos deslizantes 50F de modo que la máquina 1 se pueda mover suavemente cuando la traslade el mecanismo de indexación 50A. Durante el uso, el mecanismo de indexación 50A puede mover la máquina 1 de modo que los múltiples portadores de sustrato 20A y/o 20B de la máquina 1 reciban un sustrato 2 desde un transportador del sustrato 120 (que se muestra en la fig. 5) de modo que una muestra dispuesta sobre el sustrato 2 se pueda preparar por la máquina 1, y también de modo que, una vez preparada, el portador del sustrato 20A y/o 20B pueda proporcionar el sustrato 2 que tiene una muestra preparada se pueda proporcionar al transportador del sustrato 120 para el procesamiento de

la muestra.

Para máquinas que tienen dos plataformas 60A y 60B, como en el modo de realización ilustrado, los sustratos 2 se proporcionan típicamente al transportador del sustrato 120, y desde el mismo, de manera alterna. En algunos modos de realización, se proporciona un primer sustrato 2 desde el transportador del sustrato 120 a un primer portador del sustrato 20A, para procesarlo en una primera plataforma 60A, mientras la máquina 1 está en una primera posición. Mientras 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 modo que un segundo portador del sustrato 20B pueda recibir un segundo sustrato, para procesarlo en la segunda plataforma 60B, desde el transportador del sustrato 120. Mientras el segundo sustrato se procesa en la segunda plataforma 60B, el mecanismo de indexación 50A puede trasladar la máquina 1 de regreso a la primera posición de modo que el transportador del sustrato 120 pueda retirar el primer sustrato 2 del primer portador del sustrato 20A. Una vez que se retira el sustrato 2 de la primera plataforma portadora 20A, se puede proporcionar un sustrato siguiente a la primera plataforma portadora 20A. Este procedimiento para proporcionar sustratos a plataformas portadoras alternativas se puede aplicar para más de dos plataformas (por ejemplo, tres, cuatro, cinco o más de cinco), incrementando de este modo el rendimiento de muestras preparadas para su evaluación adicional.

Las plataformas 60A y 60B están formadas típicamente de uno o más materiales que son relativamente inertes químicamente con respecto a los fluidos usados durante el procesamiento de muestras y proporcionan una tensión de superficie adecuada. Los materiales ejemplares que se pueden usar para formar las plataformas 60A y 60B incluyen termoplásticos tecnológicos, tales como polioximetileno (por ejemplo, Delrin® fabricado por DuPont), fluorocarburos de alto peso molecular, tales como politetrafluoroetileno (PTFE) (por ejemplo, Teflon® fabricado por DuPont), y metales tales como aluminio, acero y titanio, siempre que estén fabricados y/o tratados para proporcionar una tensión de superficie adecuada que actúe para ayudar a distribuir de manera uniforme y limitar los fluidos de procesamiento al espacio entre el sustrato 2 y las plataformas, y permitir una evacuación adecuada de los fluidos de procesamiento también. Mediante la selección de 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 de superficie suficiente de modo que se reduzca o elimine la fuga de fluido por la separación entre las plataformas y el sustrato 2.

En general, el tamaño de la superficie de las plataformas 60A y 60B se puede seleccionar a voluntad para propósitos de manejo de sustrato y suministro de fluidos. Factores tales como el tamaño de la superficie de las plataformas 60A y 60B también pueden influir en el tamaño de la superficie seleccionada del sustrato 2. Por ejemplo, en algunos modos de realización, la superficie de la plataforma 60A (por ejemplo, la superficie de la plataforma 60A que se enfrenta al sustrato 2) es algo más pequeña que la superficie del sustrato 2 que se enfrenta a la plataforma 60A. Manteniendo dicha relación entre el tamaño de las superficies enfrentadas de la plataforma 60A y el sustrato 2, se puede reducir o eliminar la fuga de fluido desde la región situada entre las superficies. Típicamente, por ejemplo, la superficie del sustrato 60A que se enfrenta al sustrato 2 es más pequeña que 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).

Las plataformas 60A y 60B pueden estar sujetas a los bloques 80A y 80B, respectivamente. El bloque 80A incluye lados laterales 81A-84A que sostienen un lado superior 85A como se muestra en la fig. 2. Los bloques 80A y 80B pueden estar hechos de los mismos materiales o materiales similares a los usados para las plataformas, incluyendo metales, cerámicas y/o plásticos. Por tanto, se pueden usar materiales tales como Delrin® para formar los bloques 80A y 80B, particularmente en modos de realización que aplican la tinción de muestras de Romanowsky. Otros materiales que se pueden usar en modos de realización incluyen metales y aluminio, acero o titanio recubiertos de politetrafluoroetileno de la marca Teflon®.

En algunos modos de realización, las plataformas 60A y/o 60B pueden estar elevadas como se muestra en las figs. 1-3. De forma alternativa, en determinados modos de realización, las plataformas 60A y/o 60B pueden estar enrasadas con la superficie superior de los bloques 80A y 80B, respectivamente. En todo caso, determinadas características de la máquina 1, así como la tensión de superficie de los fluidos y la energía superficial de la plataforma o el bloque evitan que el exceso de fluido se derrame por los bordes de las plataformas 60A/60B y/o de los bloques 80A/80B.

Como se muestra en las figs. 1 y 2, la plataforma 60A puede incluir los vástagos 70A-70D para proporcionar una separación entre la superficie de la plataforma 60A y el sustrato 2, y evitar que el sustrato 2 se ponga en contacto con la plataforma 60A. La plataforma 60B puede incluir un conjunto correspondiente de vástagos 71A-71D. Los vástagos pueden incluir separadores, pasadores, clavijas, varillas, cuentas, paredes u otras estructuras que proporcionan separación entre la superficie de la plataforma 60A y/o 60B y el sustrato 2. Los vástagos 70A-70D y 71A-71D aseguran que las superficies de las plataformas 60A y 60B y el sustrato 2 permanecen sustancialmente paralelas cuando el sustrato 2 se pone en contacto con los vástagos. El beneficio de mantener estas dos superficies en paralelo es que el volumen comprendido entre estas dos superficies queda por tanto definido y se puede controlar con precisión. Si las dos superficies no están sustancialmente paralelas, y el ángulo entre ellas cambia, a continuación el volumen entre ellas también cambia y no es fijo ni se controla con precisión. Además, los fluidos pueden no aplicarse uniformemente a la muestra si dichas dos superficies no están sustancialmente paralelas.

Como se usa en el presente documento, la frase "sustancialmente paralelas" significa que dos superficies son exactamente paralelas o casi paralelas, de modo que las imperfecciones en la planitud de la superficie del sustrato 2 se reducen o eliminan cuando el sustrato 2 se pone en contacto con los vástagos. Por ejemplo, aunque se pone gran cuidado en la producción de sustratos, determinados sustratos pueden tener imperfecciones tales como torsiones y/o esquinas no coplanares. En los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento, el uso de vástagos ayuda a corregir estas imperfecciones al mejorar la planitud de la superficie del sustrato 2 donde sea necesario, orientando el sustrato 2 en una relación sustancialmente paralela a las plataformas 60A y 60B en el proceso. La frase "sustancialmente paralelas" abarca situaciones en las que las dos superficies no son perfectamente planas, pero los vástagos son todos del mismo tamaño o altura, de modo que al menos los puntos de contacto de una superficie del sustrato con los vástagos están en el mismo plano.

La FIG. 6A muestra el sustrato 2 con la muestra 3 (muestra no mostrada), el portador del sustrato 20B, los bloques 80A, 80B, las plataformas 60A, 60B, los vástagos 70A-70D y 71A-71D y la separación 92 entre el sustrato 2 y la plataforma 60B. La separación 92 permite que los fluidos circulen entre la superficie de la plataforma 60B que contiene los puertos 40B-45B y el sustrato 2 que contiene la muestra 3. La distancia de separación necesaria para la fijación, tinción y enjuague óptimos de la muestra variará dependiendo del caudal de los fluidos dosificados desde los puertos 40B-45B (y/o los puertos 40A-45A), el diámetro de los puertos, la viscosidad de los fluidos aplicados durante el procesamiento y la cantidad de succión disponible para retirar fluidos del sustrato, la separación y la plataforma.

En algunos modos de realización, por ejemplo, los vástagos que proporcionan una separación 92 de aproximadamente 100-200 micrómetros entre la superficie de la plataforma 60B y el sustrato 2 permiten la fijación, tinción y enjuague de muestras que comprenden glóbulos sanguíneos en modos de realización que pueden dosificar fluidos con caudales que van desde 70 hasta 140 microlitros por segundo (por ejemplo, 90, 115 o 125 microlitros por segundo) desde los puertos 40B-45B que tienen un diámetro que varía entre 500 y 1.500 micrómetros. En general, el tamaño o la altura de separación 92 puede variar desde aproximadamente 50 micrómetros hasta 1.000 micrómetros para determinados modos de realización (por ejemplo, desde aproximadamente 50 hasta 500 micrómetros, desde aproximadamente 75 hasta 250 micrómetros, desde aproximadamente 100 hasta 200 micrómetros), siempre que dichos modos de realización puedan superar la tensión de superficie de los fluidos en la separación mientras dosifican y retiran fluidos durante el procesamiento de muestras. Además, en determinados modos de realización, el diámetro de los puertos ubicados en la plataforma 60A y/o 60B puede variar desde aproximadamente 125 micrómetros hasta 5.000 micrómetros.

En las FIGS. 6B y 6C se muestra un mecanismo de rótula 25 que se puede usar para alinear un portador del sustrato 20A para que esté paralelo a una plataforma 60A. El mecanismo de rótula 25 puede incluir un miembro esférico 25A que está rigidamente fijado al portador del sustrato 20A, un elemento de desviación 25B (por ejemplo, un resorte), un casquillo inferior 25C que está conectado rigidamente al brazo del sustrato 10A, un casquillo superior 25D, una tapa 25E que está fijada al casquillo inferior 25C (por ejemplo, usando elementos de fijación) y un tornillo de fijación 25F. En algunos modos de realización, durante la fabricación y/o configuración de la máquina 1 y los portadores de sustrato 20A y/o 20B, el mecanismo de rótula 25 se puede ajustar para compensar cualquier desalineación que pueda estar presente debido a problemas de fabricación o acumulación de tolerancia. Para ajustar el mecanismo de rótula 25, en algunos modos de realización, se afloja el tornillo de fijación 25F y se traslada el brazo del sustrato 10A a la posición cerrada. Dado que el tornillo de fijación 25F está flojo, el portador del sustrato 20A, mientras sostiene un sustrato 2, se puede colocar sustancialmente paralelo a la plataforma 60A mientras el sustrato 2 está situado a lo largo de los vástagos de contacto 70. De forma alternativa, en algunos modos de realización, el número de vástagos de la plataforma 60 se puede reducir o eliminar por completo; se puede usar temporalmente una cuña con un grosor correspondiente a la distancia de separación deseada durante la instalación o calibración de la máquina 1 junto con el mecanismo de rótula 25 para configurar la separación 92 a una distancia deseada para el procesamiento de muestras. Aunque el mecanismo de rótula 25 esté flojo, el elemento de desviación 25B aplica fuerza para mantener el portador del sustrato 20A semifijado al brazo del sustrato 10A de modo que se pueda mover independientemente, pero no esté tan flojo y ni tenga libertad para moverse tanto como para interferir o dañar otros componentes de la máquina 1. Una vez que el sustrato 2 está presionado firmemente en posición cerrada para que el sustrato 2 esté sustancialmente paralelo a la plataforma 60A, se puede apretar el tornillo de fijación 25F para asegurar el mecanismo de rótula 25. Como se muestra, cuando se aprieta, el tornillo de fijación 25F aplica una fuerza descendente sobre el casquillo superior 25D y, por tanto, aplica una fuerza de fricción a la parte superior del miembro esférico 25A por medio del casquillo superior 25D. Dado que el casquillo inferior 25C está fijado a la tapa 25E, la fuerza creada por el tornillo de ajuste 25F también levanta el casquillo inferior 25C de modo que el casquillo inferior 25C aplica una fuerza de fricción al lado inferior del miembro esférico 25A para constreñir el miembro esférico 25A dentro de los casquillos superior e inferior 25C, 25D. Una vez constreñido el miembro esférico 25A, el portador del sustrato 20A queda fijado al brazo del sustrato 10A.

Típicamente, una vez que el portador del sustrato 20A se sitúa y constriñe con el tornillo de fijación 25F, no es necesario ajustar nuevamente el mecanismo de rótula 25 durante el uso normal. Sin embargo, si el portador del sustrato 20A se desalinea y, por lo tanto, el mecanismo de rótula 25 requiere ajuste (por ejemplo, debido a daños, reparación de la máquina, bajo rendimiento u otros motivos), se puede aflojar el tornillo de fijación 25F, se puede trasladar el portador del sustrato 20A a una posición cerrada para situarlo de modo que un sustrato sujeto por el portador del sustrato 20A esté sustancialmente paralelo a la plataforma 60A, y a continuación se puede apretar el

tornillo de fijación 25F para asegurar el mecanismo de rótula 25.

En general, los accionadores 30A y/o 30B se pueden configurar para ajustar la posición de los brazos del 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. Variar esta separación proporciona mayor flexibilidad en los modos de realización que permiten ajustar los flujos asignados a cada puerto, los caudales, la viscosidad de los fluidos y las fuerzas de evacuación desde las plataformas 60A y/o 60B. Por ejemplo, una separación 92 de 100 micrómetros puede proporcionar suficiente fijación, tinción y enjuague de la muestra cuando los fluidos aplicados desde la plataforma 60A se dosifican a un caudal de 70 microlitros por segundo desde los puertos 40A-45A que tienen diámetros del puerto que varían desde 500 micrómetros hasta 1.500 micrómetros. De forma alternativa, con una distancia de separación 92 entre la superficie de la plataforma 60A y el sustrato 2 de aproximadamente 200 micrómetros, se puede usar un caudal mayor para fluidos dosificados desde los puertos 40A-45A, tal como 115-140 microlitros por segundo, para el procesamiento de muestras.

Como se divulga anteriormente, la máquina 1 puede contener una serie de puertos y tubos para dispersar y retirar fluidos aplicados durante el procesamiento de muestras. El siguiente análisis describe diversos puertos, tubos y otros componentes asociados con la plataforma 60A, pero se aplican consideraciones similares a la plataforma 60B y sus componentes asociados. En la FIG. 2 se muestra una vista ampliada del aparato que se muestra en la fig. 1, y muestra en detalle los puertos 40A-45A de la plataforma 60A y los tubos 50A-55A conectados al bloque 80A. Los tubos 52A-55A distribuyen determinados fluidos incluyendo uno o más fijadores, colorantes y soluciones de enjuague a lo largo de la plataforma, a la separación y sobre el sustrato.

En referencia a la fig. 2, el lado superior de la plataforma 60A incluye seis puertos 40A-45A que están conectados a los tubos 50A-55A. Una o más bombas impulsan los fluidos a través de los tubos y puertos sobre el sustrato 2. Uno o más depósitos de fluido 210A-213A (tal como un primer depósito de colorante 211A, un segundo depósito de colorante 212A, un depósito de fijador 210A y un depósito de solución de enjuague 213A), por ejemplo, como se muestra en la fig. 4, pueden dirigir fluido sobre la plataforma 60A y el sustrato 2. El diámetro de los puertos 40A-45A mostradas en las figs. 1-3 varía desde aproximadamente 500 micrómetros hasta 1.500 micrómetros, aunque el diámetro también puede ser más pequeño o más grande en determinados modos de realización. En algunos modos de realización, el diámetro de los puertos de vacío 40A y 41A es más del doble del diámetro de los puertos de fluido 42A-45A.

Cada uno de los puertos 40A-45A está típicamente dedicada a una fuente particular de fluido o vacío. De forma alternativa, se puede usar más de un puerto para cada fuente de fluido o vacío, o se pueden conectar múltiples tubos de diversas fuentes de fluido y vacío a un solo puerto ubicado en la plataforma 60A. Por ejemplo, en algunos modos de realización solo se puede usar un puerto en la plataforma 60A para la retirada de residuos, pero cuando se usan fluidos más viscosos, el puerto único puede no proporcionar suficiente succión para evacuar el fluido residual de la plataforma. Por tanto, puede ser deseable en determinados modos de realización proporcionar dos puertos de succión en diferentes posiciones de la plataforma (por ejemplo, un puerto de succión en cada extremo de la plataforma) para retirar el exceso de fluidos colorantes, fijadores y de enjuague como se muestra con los puertos 40A y 41A en la fig. 2. Destacando aún más la variabilidad de las configuraciones de fluido a puerto, en determinados modos de realización un único puerto de la plataforma 60A puede estar destinada específicamente para un colorante concreto, mientras que en otros modos de realización se usan múltiples puertos para aplicar colorantes durante el procesamiento de muestras. De hecho, se pueden usar diversas combinaciones relacionadas con el número de puertos, ubicación de los puertos y fluidos asignados a cada puerto y tubo de fluido en diferentes modos de realización de la invención.

Los puertos 40A-45A pueden estar situadas generalmente del modo deseado en la plataforma 60A para proporcionar suministro de fluidos al sustrato 2 y retirada de fluidos del mismo. Típicamente, cada uno de los puertos de fluido está situada en la plataforma 60A de modo que la abertura del puerto no esté situada directamente contigua o debajo de la muestra 3 en el sustrato 2 cuando se está procesando la muestra. Con determinadas combinaciones de muestras y colorantes, por ejemplo, si los colorantes se dosifican desde un puerto ubicado directamente contigua o debajo de una parte de la muestra 3, se puede aplicar una cantidad mayor de colorante a las células de esa parte (en las proximidades del puerto) que a las células de otras partes de la muestra. Como resultado, las células que reciben la cantidad mayor 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 diagnósticas y en los resultados analíticos basados en las imágenes. Por tanto, los puertos de fluido que suministran colorante a la muestra 3 pueden estar espaciadas a determinada distancia de la zona de un portaobjetos que contiene la muestra para mejorar los resultados de la tinción.

Además, el uso de pares de puertos, por ejemplo, múltiples pares de puertos, ubicados uno frente a otro, también puede mejorar la uniformidad de la tinción. Por ejemplo, en algunos modos de realización se usan dos puertos para suministrar colorante a la muestra 3. Los dos puertos pueden estar ubicados en la plataforma 60A en posiciones espaciadas una determinada distancia (por ejemplo, desplazadas) de los bordes de la muestra 3, y ubicados uno frente a otro en dirección paralela a los bordes cortos de la plataforma 60A. Cuando se dosifica colorante desde los dos puertos espaciados, se deposita una cantidad relativamente uniforme de colorante en las células en diferentes regiones de la muestra 3, y se observa una mejor homogeneidad de la tinción en las imágenes de la muestra.

De forma similar, mientras que los puertos 40A-45A pueden estar situadas generalmente del modo deseado para

retirar el exceso de fluidos de la superficie del sustrato 2 usando una o más fuentes de vacío, en algunos modos de realización los puertos que se usan para retirar fluidos están espaciadas 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. Situar los puertos de retirada de residuos de esta manera (es decir, no directamente opuestas a una parte de la muestra 3) reduce las posibilidades de que cuando se accionen dichos puertos para evacuar fluidos del sustrato 2, las células de la muestra 3 se dañen involuntariamente o sean arrastradas a los puertos de retirada de fluidos. En determinados modos de realización, debido a la diferencia de longitud de los lados largo y corto de la plataforma 60A, los puertos de retirada de residuos están separados del borde de la zona de muestras y están dispuestas una frente a otra a lo largo de una dirección paralela a los bordes largos de la plataforma 60A.

Fases de fijación

Los tubos de fluido 52A-55A y 52B-55B pueden estar situados para suministrar fijador a las plataformas 60A y 60B, la separación 92, el sustrato 2 y la muestra 3 durante el procesamiento de muestras. Los fijadores que se pueden usar incluyen productos químicos usados para proteger muestras biológicas de la descomposición, y dichos fijadores pueden impedir que se produzcan reacciones bioquímicas en la muestra e incrementar la resistencia mecánica y la estabilidad de la muestra. Se pueden usar diversos fijadores, incluyendo, pero sin limitarse a, metanol, etanol, isopropanol, acetona, formaldehído, glutaraldehído, EDTA, tensioactivos, sales metálicas, iones metálicos, urea y compuestos amínicos.

En referencia a la fig. 4, se pueden conectar uno o más tubos de fluido 52-55A a un puerto dentro de la plataforma 60A y a un depósito de fijador respectivo 210A. Los tubos de fluido pueden incluir también una conexión a una bomba 200A y/o a una válvula que puede dirigir fijadores desde el depósito a través del tubo y de un puerto ubicado en la plataforma, y sobre un sustrato y una muestra. Como ejemplo, la bomba 200A puede dirigir el fijador desde el depósito 210A a través del tubo 54A, a través del bloque 80A, por el puerto 44A, sobre la plataforma 60A, a la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2, y sobre el sustrato 2 que contiene la muestra 3. Después de aplicar una cantidad específica de fijador al sustrato 2, una fuente de vacío u otra fuente de succión 220A y/o 221A puede evacuar el fijador residual de la plataforma 60A, la separación 92 y el sustrato 2 al recipiente de residuos 230A y/o 231A por medio de una o más de los puertos 40A y/o 41A a través de los tubos de residuos 50A y 51A.

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

En algunos modos de realización, la bomba 200A dirige el metanol a través del tubo 54A y el puerto 44A, sobre la plataforma 60A y a la separación 92 a un caudal de 70 microlitros por segundo durante un período de cuatro segundos. Una fuente de vacío u otra fuente de succión 220A y/o 221A retira a continuación el metanol residual presente en la separación 92 y/o en la plataforma 60A y en el sustrato 2 usando los puertos 40A y/o 41A y los tubos de residuos 50A y/o 51A (que se describen adicionalmente a continuación). A continuación, la bomba 200A puede dirigir nuevamente el metanol a través del tubo 54A y el puerto 44A, y sobre la plataforma 60A a un caudal de 70 microlitros por segundo durante un período de cuatro segundos, seguido de un segundo proceso de evacuación de fluidos. Este proceso de fijación y evacuación se puede repetir nuevamente, usando el mismo fijador o uno diferente, dependiendo del tipo de muestra biológica que requiera fijación. Además, la máquina 1 puede variar la frecuencia y los caudales para cada fase de fijación. También se pueden usar otros caudales suficientes para superar cualquier tensión de superficie en el fluido ubicado en la separación 92 y fijar la muestra 3 para su procesamiento y evaluación adicional. Ajustando la frecuencia y/o el caudal de las fases de fijación, la máquina 1 puede lograr una fijación óptima para diversas muestras usando varios fijadores diferentes. Las instrucciones de la máquina para diferentes tipos de muestras pueden estar cableadas o preprogramadas en la unidad de control 5 y las puede seleccionar un operario del sistema a discreción.

En general, se puede aplicar una amplia variedad de fijadores a las muestras durante las fases de fijación. Por ejemplo, se puede usar metanol al 85 % como fijador. Para algunos colorantes se puede usar un fijador a base de alcohol etílico o formaldehído. Se divulgan formulaciones adicionales de fijador que se pueden usar para preparar la muestra, por ejemplo, en la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/505.011.

Fases de tinción

La máquina 1 también incluye tubos y puertos configurados para aplicar uno o más tintes o colorantes a una muestra fijada a un sustrato en una o más fases de tinción. La tinción de una muestra incrementa el contraste de la muestra cuando se observa o se obtiene una imagen bajo un microscopio u otro dispositivo de imagen. Se pueden usar tinciones de Romanowsky y/u otros tintes o colorantes, incluyendo hematoxilina y eosina, fluoresceína, colorantes de tiacina usando anticuerpos, sondas de ácido nucleico y/o sales e iones metálicos. Se divulgan formulaciones adicionales de colorante que se pueden usar para preparar la muestra, 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 colorante a una muestra. En la etapa 802, una bomba (por ejemplo, la bomba 201A) dirige el tinte o el colorante desde un depósito (por ejemplo, el depósito 211A) a un tubo de colorante (por ejemplo, el tubo 52A). En la etapa 804, el colorante se dirige a un puerto (por ejemplo, el puerto 42A) sujeta al bloque 80A. A continuación, en la etapa 806, el colorante fluye desde del puerto 42A de la plataforma 60A. En la etapa 808, el colorante fluye a la separación 92 entre el sustrato 2 y la plataforma 60A y, después de esto, en la etapa 810, tiñe la muestra 3 sobre el sustrato 2.

En algunos modos de realización, se pueden usar múltiples tubos y puertos para aplicar 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 dosificado desde el depósito 211A) desde el depósito 212A a través del tubo 53A y el puerto 43A y sobre la plataforma 60A. En determinados modos de realización se pueden conectar dos o más tubos de fluido a un depósito de colorante o bomba y/o válvula compartidos usados para dirigir el colorante a través de los puertos y sobre la plataforma. En referencia de nuevo a la fig. 2, el tubo 52A puede suministrar colorante rojo, tal como un tinte de fluoresceína, a la plataforma, el sustrato 3 y la muestra 2. El tubo 53A puede suministrar un colorante azul, tal como un tinte de tiacina. En las figs. 1-6, el número, ubicación y tamaño de los puertos de la plataforma 60A se seleccionan para optimizar la aplicación de colorante a una muestra fijada al sustrato. Si se seleccionan otros colorantes, puede ser preferible un número, ubicación y tamaño diferente de los puertos dependiendo de la viscosidad del colorante.

Cada uno de los puertos 40A-45A (y 40B-45B) puede incluir un canal de entrada para recibir fluido y un canal de salida para emitir fluido. En algunos modos de realización, los canales de salida de los puertos del enjuague 45A, del fijador 44A y de tinción 42A-43A están en la superficie superior de la plataforma 60A, y los canales de entrada de los puertos de vacío 40A y 41A pueden estar en los extremos opuestos de la superficie superior de plataforma 60A. Los canales de entrada de los puertos del enjuague 45A, del fijador 44A y de tinción 42A-43A pueden estar situadas en el mismo lateral del bloque 80A, y los canales de salida de los puertos de vacío 40A y 41A pueden estar situadas en laterales opuestos del bloque 80A.

A modo de ejemplo y con referencia a las figs. 2 y 10, el sistema de control 5 da instrucciones a una bomba (por ejemplo, la bomba 201A) en la etapa 802 para que dirija un colorante (por ejemplo, un colorante que comprende tinte de fluoresceína) desde un depósito de colorante al tubo de fluido 52A. En la etapa 804, el colorante entra en el puerto 42A desde el tubo de fluido. A continuación, en la etapa 806, el colorante sale del puerto 42A a un caudal de 140 microlitros por segundo, durante un período de cinco segundos, y en la etapa 808, el colorante se deposita en 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. Después de la tinción, una fuente de vacío u otra fuente de succión (por ejemplo, las bombas 220 y/o 221) puede evacuar el colorante residual presente en la separación 92, en la plataforma 60A y en el sustrato 3 usando los puertos 40A-41A y los tubos de residuos 50A-51A.

La máquina 1 se puede programar para repetir estas fases de tinción y evacuación después de un retraso (por ejemplo, un retraso de entre 3 segundos y 10 segundos, tal como un retraso de cinco segundos), después de la primera fase de tinción. Una segunda bomba 202A puede recibir instrucciones del sistema de control 5 para dirigir el tinte de tiacina desde un depósito de colorante a través del tubo de fluido 53A, por el puerto 43A a un caudal de 140 microlitros por segundo y sobre la plataforma 60A durante un período de tiempo, por ejemplo, tres segundos. Una fuente de vacío u otra fuente de succión (por ejemplo, la bomba 220A y/o 221) puede evacuar a continuación el tinte de tiacina residual presente en la separación 92 y/o en la plataforma 60A y/o en el sustrato 2 usando los puertos 40A-41A y los tubos de residuos 50A-51A. Al igual que con las fases de fijación, la máquina 1 puede variar la frecuencia, los tiempos de retraso y los caudales para cada fase de tinción. El caudal puede variar, por ejemplo, de 70 a 140 microlitros por segundo, o puede ser más pequeño o mayor que los límites externos de este intervalo (por ejemplo, 10 a 500 microlitros por segundo) siempre que el caudal sea suficiente para superar cualquier tensión de superficie. presente en el fluido ubicado en la separación 92 y de forma deseable teñir la muestra para la evaluación prevista.

Los inmunoensayos ejemplares que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a: colorante de Wright-Giemsa, colorantes de Giemsa y colorantes de Romanowsky. También se pueden aplicar a las muestras otros agentes tales como reactivos inmunocitoquímicos u otros marcadores de componentes celulares específicos.

Eliminación de fluido residual

Como se indicó anteriormente, una fuente de vacío u otra fuente de succión 220 y/o 221 puede evacuar el fluido residual del sustrato 2, la separación 92 y la plataforma 60A durante las fases de fijación y tinción o entre ellas. En referencia a la fig. 1, se pueden conectar uno o más tubos de residuos a los lados 82A y 84A del bloque 80A. Los tubos de residuos o de vacío 50A y 51A se usan para extraer fluido y pequeñas partículas de la plataforma 60A, la separación 92 y el sustrato 2 a un recipiente de residuos u otra ubicación separada de la máquina 1. Con referencia a la fig. 2, los tubos de residuos 51A y 51B pueden estar conectados a fuentes de vacío separadas 220 y 221, y a los recipientes de residuos 230 y 231, en los extremos distales de los tubos de residuos. De forma alternativa, se pueden conectar dos o más tubos de residuos a una única fuente de vacío y al mismo recipiente de residuos, como se muestra en la fig. 4. Los tubos de residuos 50A y 50B se pueden extender a través de las válvulas de presión 90A y 90B,

respectivamente.

Se puede conectar una fuente de 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 residuos 50A, 50B, 51A y 51B para extraer fluido de las plataformas 60A y/o 60B, de la separación 92 y del sustrato 2 a recipientes de residuos 230 y 231. La fuerza de vacío aplicada dentro de los tubos de residuos puede ser equivalente a entre 68,9 mbar negativos y 689 mbar negativos (una a diez libras negativas por pulgada cuadrada ["psi"]) para proporcionar una succión suficiente para retirar fluidos cuando la separación entre el sustrato 2 y la plataforma tiene entre 100 y 200 micrómetros. En general, como se usa en el presente documento, la presión "negativa" se refiere a una presión menor que la presión ambiente dentro de la máquina 1 o el entorno circundante de la máquina 1. Por ejemplo, en algunos modos de realización, el entorno circundante de 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 68,9 mbar negativos [una psi] aplicada a un fluido es una presión de 68,9 mbar [una psi] menos que la presión del aire ambiente ejercida sobre el fluido). Se pueden usar otros vacíos que varían desde 6,9 mbar (0,1 psi) negativos hasta 695 mbar (14 psi) negativos (por ejemplo, 413 mbar [seis psi] negativos), o mayores, siempre que dichos vacíos sean suficientes para superar cualquier tensión de superficie del fluido presente en la separación y retirar todo el fluido residual de la separación y sobre el sustrato y la muestra. Además, inmediatamente antes de aplicar vacío para evacuar fluidos de la separación, el accionador 30A puede elevar el borde próximo del sustrato 2 a una distancia de 15-35 micrómetros desde la posición de procesamiento de muestras. Esta separación incrementada 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 algunos modos de realización, el sistema de control 5 está configurado para variar la frecuencia y el vacío aplicado para la retirada de fluido durante el procesamiento de muestras. La FIG. 11A incluye un diagrama de flujo 900 con 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 presión 90A y/o 90C en la etapa 902 y aplicar un vacío de 344 mbar (5 psi) negativos en los tubos de residuos (por ejemplo, los tubos de residuos 50A y 51A) durante un período de cinco segundos. Durante este período se retira el fijador (etapa 904) de la separación, sustrato y plataforma a través de los puertos 40A y 41A. El fluido circula a través de los tubos de residuos en la etapa 906, y se deposita en uno o más recipientes de residuos (por ejemplo, los recipientes 230 y/o 231) en la etapa 908. Una vez que finaliza el período de evacuación, el sistema de control 5 puede dar instrucciones a una o más de las válvulas de presión 90A, 90C para que cierren los tubos de residuos 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 ordenar a la máquina 1 que repita esta etapa de retirada de fluido después de cada fase de fijación.

La FIG. 11B incluye un diagrama de flujo 1000 con una serie alternativa de etapas para retirar el exceso de fluido de un sustrato. El procedimiento del diagrama de flujo 1000 no usa válvulas de presión para cerrar los tubos de residuos. 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 206,8 mbar (3 psi) negativos en los tubos de residuos 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 puertos 40A y 41A en la etapa 1006. El fluido evacuado circula a través de los tubos de residuos 50A y/o 51A en la etapa 1008, y se deposita en uno o más recipientes de residuos 230, 231 en la etapa 1010. La máquina 1 puede repetir esta etapa de retirada de fluidos después de cada fase de aplicación de fluido. Variando la frecuencia y la presión aplicadas durante las etapas de retirada de fluidos, la máquina 1 puede lograr una fijación, tinción y enjuague óptimos de las muestras biológicas.

Las válvulas de presión 90A, 90B, 90C y 90D cierran los tubos de residuos 50A, 50B, 51A y 51B, como se muestra en la fig. 1. Las válvulas de presión 90A-90D se pueden accionar mecánica, eléctrica, hidráulica o neumáticamente a través de accionadores contenidos dentro o fuera de las válvulas. Las válvulas de presión 90A-90D funcionan para impedir el flujo de fluido a través de los tubos de residuos 50A, 50B, 51A y 51B. Por ejemplo, al cambiar o vaciar un recipiente de residuos 230 lleno de la máquina 1, puede ser deseable cerrar las válvulas de presión (90A-90D) para evitar fugas de fluidos residuales presentes en los tubos de residuos. Se pueden usar diferentes tipos de válvulas u otros mecanismos tales como pinzas o tapones con modos de realización de la máquina 1 para cerrar los tubos de residuos 50A, 50B, 51A y 51B.

Fases de enjuague

Las soluciones de enjuague se pueden aplicar durante el procesamiento de muestras con la máquina 1 en una o más fases de enjuague. Por ejemplo, puede ser deseable retirar los fluidos residuales y/o sobrantes 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 enjuague compatibles con los presentes sistemas y procedimientos incluyen agua destilada, soluciones acuosas amortiguadas, disolventes orgánicos y mezclas de disolventes acuosos y orgánicos, con o sin amortiguación. Se divulgan formulaciones adicionales para soluciones de enjuague que se pueden usar para preparar la muestra, 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 enjuagar una muestra. En la etapa 1102,

una bomba (por ejemplo, la bomba 203A) dirige solución de enjuague (por ejemplo, que comprende agua destilada) desde un depósito (por ejemplo, el depósito 213A) a un tubo de enjuague (por ejemplo, el tubo de enjuague 55A). En la etapa 1104, la solución de enjuague entra en el puerto 45A conectado al bloque 80A. En la etapa 1106, la solución de enjuague fluye sobre la plataforma 60A a través del canal de salida del puerto 45A, y en la etapa 1108, la solución de enjuague entra en la separación 92 entre el sustrato 2 y la plataforma 60A. En la etapa 1110 se realiza el enjuague 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 residuos 50A y 51A para retirar la solución de enjuague de la separación 92 y del sustrato 2; la solución de enjuague se transporta al recipiente de residuos 230 y/o 231.

En algunos modos de realización, el sistema de control 5 puede ordenar a la bomba 203A que aplique la solución de enjuague a un caudal, por ejemplo, de 70 microlitros por segundo durante un período, por ejemplo, de 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 enjuague y el número de fases de enjuague. Además, el sistema de control 5 puede ajustar la colocación de una o más fases de enjuague durante el procesamiento de muestras. El sistema de control 5 puede, por ejemplo, ordenar que una fase de enjuague tenga lugar una vez, después de completar todas las fases de fijación, y que una segunda fase de enjuague tenga lugar una vez, después de completar todas las fases de tinción. De forma alternativa, se pueden intercalar fases de enjuague entre dos o más fases de fijación o entre dos o más fases de tinción.

Fases de agitación

El procesamiento de muestras en determinados modos de realización puede incluir una o más fases de agitación para dispersar fluidos fijadores, colorantes y/o de enjuague a lo largo de la separación 92, el sustrato 2 que contiene la muestra 3 y las plataformas 60A y/o 60B durante las etapas de fijación, tinción y/o enjuague. La FIG. 13 incluye el diagrama de flujo 1200 con una serie de etapas para agitar una muestra. El accionador 30A y/o 30B, que se muestra en la fig. 3A, puede proporcionar un ajuste fino del movimiento para cambiar la posición del sustrato 2 con respecto a la plataforma 60A y/o 60B.

El sistema de control 5 puede incluir programas informáticos y/o equipos informáticos para dar instrucciones al accionador 30A y/o 30B para que inicie una fase de agitación. El accionador 30A y/o 30B se puede configurar para mover el brazo del sustrato 20A y/o 20B hacia arriba y hacia abajo tras un comando de inicio de agitación desde el sistema de control. La fase de agitación se puede repetir durante un número predeterminado de ciclos de agitación. El término "ciclo de agitación", como se usa en el presente documento, se refiere al movimiento desde una posición inicial en sentido ascendente, seguido de un movimiento en sentido descendente opuesto al sentido ascendente. En algunos modos 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 determinados modos de realización, el sustrato 2 no regresa a la posición inicial al final de algunos o todos los ciclos de agitación, pero cada ciclo todavía incluye un movimiento ascendente seguido de un movimiento descendente. El accionador 30A y/o 30B típicamente continúa moviendo el sustrato 2 en uno o más ciclos de agitación hasta que se envía un comando de parada al accionador desde el sistema de control 5. Una fase de agitación puede incrementar temporalmente el tamaño de la separación (distancia de separación) entre el sustrato 2 y la superficie de la plataforma 60A y/o 60B, y a continuación devolver el sustrato a la posición de procesamiento de muestras. Además, una fase de agitación puede incluir una serie de movimientos que desplazan el sustrato 2 entre una posición angular con respecto a la superficie de la plataforma 60A y/o 60B y la posición de procesamiento de muestras. La tensión de superficie en los fluidos dosificados en 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 muestras durante la fase de agitación y puede mejorar de forma ventajosa la distribución de fluido a lo largo de la muestra.

También se pueden usar otros procedimientos para mover el sustrato 2 con respecto a las plataformas durante las fases de agitación. Por ejemplo, en algunos modos de realización, la posición de uno o más de los vástagos 70A-D y/o 71A-D (por ejemplo, la medida en que se prolongan los vástagos por encima de la superficie de las plataformas 60A y/o 60B) se puede ajustar rápidamente para agitar la muestra 3. En determinados modos de realización, la posición de las plataformas 60A y/o 60B se puede ajustar para provocar la agitación de la muestra 3. Por ejemplo, las plataformas 60A y/o 60B se pueden mover de forma alternativa ascendente y descendente (por ejemplo, correspondiente al sentido del movimiento del sustrato 2 descrito anteriormente) para provocar la agitación de la muestra 3.

En algunos modos de realización, la agitación de la muestra 3 se puede efectuar variando el grado en que el accionador 30A y/o 30B impulsa el sustrato 2 hacia los vástagos 70A-D y/o 71A-D cuando los brazos del sustrato están hechos de un material que se flexiona, como se analiza a continuación. Se pueden usar extensómetros para medir y ajustar la frecuencia de la agitación aplicada al sustrato 2 detectando la variación de la tensión en los brazos del sustrato en función del tiempo.

En 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 accionador 30A para que comience un ciclo de agitación. En respuesta a esta instrucción, el accionador 30A gira el sustrato 2 hacia arriba en la etapa 1206, incrementando la distancia entre el sustrato 2 y la plataforma 60A. A continuación, en la etapa 1208, el accionador 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 ha de continuar, el control regresa a la etapa 1204 y se produce nuevamente la rotación del sustrato 2 por el accionador 30A en otro ciclo de agitación. Si ha de terminar la fase de agitación, entonces el control pasa desde la etapa 1210 hasta la etapa 1212, donde el sustrato 2 vuelve a su posición inicial con la agitación completa.

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

20 También se pueden usar combinaciones alternativas de distancias y frecuencias de agitación. Por ejemplo, en algunos modos de realización, la distancia de agitación es de 5 micrómetros o más (por ejemplo, 15 micrómetros o más, 25 micrómetros o más, 50 micrómetros o más, 100 micrómetros o más, 150 micrómetros o más, 200 micrómetros o más, 250 micrómetros o más, 300 micrómetros o más, 500 micrómetros o más, 700 micrómetros o más, 1 mm o más). Por ejemplo, en determinados modos de realización, la distancia de agitación está entre 35 micrómetros y 350 micrómetros.

25 En algunos modos 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).

30 También se pueden usar técnicas de agitación adicionales. Por ejemplo, en algunos modos de realización, el portador del sustrato 20A y/o 20B puede incluir un accionador que gira el sustrato alrededor de un eje perpendicular al eje de rotación del accionador 30A y/o 30B representado en las figs. 1 y 3.

35 De forma alternativa, la plataforma 60A y/o 60B puede estar equipada con un regulador de los vástagos para subir o bajar uno o más vástagos 70A-D y/o 71A-D durante las fases de fijación, tinción y enjuague. Para aplicar el regulador de los vástagos, la plataforma 60A y/o 60B puede incluir vástagos que están sujetos a una placa interna en la plataforma. La altura de la placa se puede modificar usando un accionador interno, modificando por tanto la altura de los vástagos. De forma alternativa, la posición de los vástagos 70A-D y 71A-D con respecto al sustrato 2 se puede cambiar dando instrucciones al accionador para que mueva la plataforma 60A y/o 60B, o el bloque 80A y/o 80B,
40 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 fluidos, el caudal, la altura de los vástagos, la distancia de separación y los parámetros y la frecuencia de agitación para procesar muestras más eficazmente, usando significativamente menos volúmenes de fluido durante el proceso de preparación de muestras en comparación con las técnicas convencionales de tinción y preparación.

45 En algunos modos de realización, los brazos del sustrato pueden estar hechos de un material que se flexiona de modo que si un sustrato en la posición de procesamiento de muestras descansa solo sobre dos vástagos que se extienden desde la plataforma, un accionador u otro elemento de fuerza motriz puede girar el portaobjetos más hacia la superficie de la plataforma hasta que el portaobjetos descansa sobre los cuatro vástagos. Variar la posición del sustrato entre estas dos posiciones puede lograr una agitación suficiente durante el procesamiento de muestras. Los brazos del sustrato pueden incluir extensómetros para controlar la tensión en el brazo del sustrato, y se pueden usar para informar al sistema de control 5 de la posición del sustrato con respecto a los vástagos de la plataforma. Además, el sistema de control puede incluir información correspondiente a las imperfecciones del grosor del sustrato, que los sistemas de control pueden tener en cuenta al colocar el sustrato en la posición de procesamiento de muestras o durante las fases
50 de agitación.

55 En determinados modos de realización, algunas o todas las etapas de agitación divulgadas en el presente documento se pueden realizar sin mover el sustrato 2 con respecto a la plataforma 60A/60B y/o los vástagos 70A-D/71A-D. Es decir, el fluido que se ha introducido entre la muestra en el sustrato 2 y la plataforma se puede agitar o refrescar sin mover el sustrato ni la plataforma, por ejemplo, cuando la plataforma y el sustrato se mantienen paralelos, o aproximadamente paralelos entre sí. En algunos modos de realización, para garantizar que el fluido nuevo entre en contacto con el mayor número posible de células de muestra en el sustrato, el fluido se puede agitar o refrescar usando las bombas divulgadas en el presente documento (por ejemplo, las bombas 200A/B y/o 201A/B y/o 202A/B y/o 203A/B) para introducir fluido en el hueco entre el sustrato 2 y la plataforma 60A/60B en la posición cerrada, y a continuación una vez que se ha llenado el hueco, para introducir un pequeño volumen adicional de fluido, por ejemplo, el mismo volumen o uno menor que el volumen introducido originalmente, en el hueco desde uno o más puertos de entrada o
60
65

de suministro de fluidos en un extremo de la plataforma 60A/B, de modo que una parte o todo el fluido original se expulse del hueco y nuevo fluido tome su lugar en el hueco. Este proceso se puede repetir múltiples veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o más de 5 veces).

5 En determinados modos de realización, las muestras se pueden preparar con un flujo pulsátil de fluido a lo largo de la muestra (por ejemplo, en el sustrato 2) y la plataforma, y/o con ciclos de flujo repetidos de fluido que se mueven a lo largo de la muestra y la plataforma, en lugar de agitar el fluido que ya se ha dosificado en el hueco o separación entre el sustrato y la plataforma. Por ejemplo, se puede dosificar fluido en el hueco o separación a través de uno o más puertos de entrada o suministro de fluido ubicados en un extremo de la plataforma. Simultáneamente o poco después de esto, se puede aplicar vacío a uno o más puertos de vacío (por ejemplo, los puertos 220 y/o 221) o a una tolva de vacío ubicada en el extremo opuesto (con respecto al [los] puerto[s] de entrada) y/o en los lados de la plataforma 60A/B). La acción de dosificación y aspiración simultánea puede crear un flujo de fluido pulsátil (rítmico o no rítmico) a lo largo del área de muestras del sustrato y la plataforma. Con un equilibrio apropiado de un caudal de dosificación de fluido y un caudal de retirada de fluido desde una fuente de vacío, el flujo de fluido se puede controlar o variar para lograr la fijación, tinción y/o enjuague deseados de la muestra.

Los caudales de dosificación para las diversas aplicaciones pueden variar desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 250 microlitros por segundo, y el vacío puede variar desde una presión negativa de aproximadamente 68,9 mbar (una psi) hasta aproximadamente 689,5 mbar (diez psi). Las etapas de dosificación y retirada de fluido se pueden intercalar para crear ciclos de flujo sucesivos (por ejemplo, 2 ciclos, 3 ciclos, 4 ciclos, 5 ciclos o más de 5 ciclos), cada uno de los cuales comprende una etapa de dosificación y retirada de fluido, para fijar, teñir o enjuagar la muestra. En cualquiera de los modos de realización divulgados en el presente documento, incluidas las aplicaciones anteriores, la plataforma 60A/B puede tener una ligera pendiente descendente desde el extremo de la entrada de dosificación de fluidos hasta el(los) puerto(s) de vacío ubicado(s) en el extremo opuesto de la plataforma de modo que la fuerza gravitatoria contribuya al flujo de fluido a lo largo de la plataforma. La pendiente puede ser un ángulo que varía de aproximadamente 2, 3, 4 o 5 grados o más a aproximadamente 45 grados o más, por ejemplo, aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 45 grados.

Fases de secado

30 En determinados modos de realización, el sistema de control 5 puede secar la muestra usando un secador 4 conectado a la máquina 1. La FIG. 14 incluye un diagrama de flujo 1300 con una serie de etapas para secar una muestra. Después de la etapa inicial 1302 en la que se verifica la finalización de la tinción y de otras fases (por ejemplo, una o más fases de enjuague), en la etapa 1304 el secador 4 dirige un flujo de aire a lo largo de la muestra. El proceso 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 lo largo 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 del flujo de aire aplicado y la(s) fase(s) durante el procesamiento de muestras para secar la muestra 3. Por ejemplo, después de completar una fase de tinción, el secador 4 puede dirigir un flujo de aire a aproximadamente 48,9 °C (120 °F) a un caudal de 10 litros por minuto durante un período de 7 segundos a lo largo de la muestra. También se pueden usar otras temperaturas del aire (por ejemplo, una temperatura ambiente de hasta 148,9 °C [300 °F]), caudales de aire (por ejemplo, un litro por minuto a 100 litros por minuto) y períodos de flujo de aire (por ejemplo, desde unos pocos segundos hasta varios minutos).

Sistemas de examen de muestras

Las máquinas y aparatos automatizados de preparación de muestras divulgados en el presente documento, incluida la máquina 1, generalmente se pueden usar con sistemas de examen de muestras más grandes, y/o incorporarse a los mismos, tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2009/0269799. Por ejemplo, la fig. 15 muestra un diagrama esquemático que ilustra un posible modo de realización de un sistema de 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 dosificador 2800, un dispositivo de descarga 2900, una etiquetadora de portaobjetos 3000 y un lector de etiquetas de portaobjetos 3100. Se puede configurar un impulsor 2110 para recibir una o más portaobjetos u otros sustratos 2700. El impulsor 2110 puede estar sujeto a una superficie, tal como la superficie superior 2101, de la plataforma. El impulsor 2110 puede tomar la forma de una cinta, y el sistema puede usar un brazo mecánico, gravedad, magnetismo, un sistema hidráulico, engranajes u otras técnicas de locomoción para mover muestras montadas en un 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 sustratos 2700 (por ejemplo, portaobjetos) desde o hacia una pila o estante. El alimentador 2102 puede estar equipado con un mecanismo propulsor del alimentador 2103 (tal como ruedas de goma) para empujar las muestras sobre el impulsor 2110. De forma alternativa, se podría usar un brazo mecánico para agarrar los sustratos 2700 y colocar los sustratos directamente en el impulsor. Se pueden usar mecanismos alternativos para impulsar los sustratos por el 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 permanentemente al ordenador de la recepción de una muestra montada en un sustrato.

El dispositivo receptor de luz 2200 puede ser un microscopio (tal como un microscopio de campo claro), una cámara de vídeo, una cámara fija u otro dispositivo óptico que recibe luz. Los modos de realización que incluyen un microscopio de campo claro estándar también pueden incluir una platina automatizada (por ejemplo, un transportador del sustrato 2201) y un enfoque automatizado. En algunos modos de realización, un microscopio puede estar conectado a una platina motorizada y a un accesorio de motor de enfoque. El microscopio puede tener una portaobjetivos motorizado para permitir la selección de objetivos con diferentes aumentos bajo el control del ordenador 2300. Se puede usar una rueda de filtros para permitir que el ordenador 2300 seleccione automáticamente filtros de color de banda estrecha en la trayectoria de la luz. Los filtros se pueden sustituir por iluminación LED, y el uso de LED puede reducir el tiempo de tratamiento de imágenes en comparación con el tiempo necesario para la rotación de la rueda de filtros. Por ejemplo, se puede usar una cámara FireWire® (IEEE 1394 bus serie de alto rendimiento) de 1600 x 1200 píxeles para adquirir imágenes de banda estrecha.

En algunos modos de realización, el dispositivo receptor de luz 2200 recibe luz reflejada desde el sustrato 2700 y almacena una o más imágenes formadas por la luz reflejada. De forma alternativa, o además, en algunos modos de realización, la emisión fluorescente de la muestra sobre el sustrato se puede detectar mediante el dispositivo receptor de luz 2200.

En determinados modos de realización, el dispositivo receptor de luz 2200 está configurado para obtener imágenes de transmisión de muestras en sustratos. Por ejemplo, la fuente de emisión de luz 2600 se puede situar debajo de la plataforma y puede dirigir la luz de modo 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 demás componentes que se muestran en la fig. 15 se pueden interconectar al 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 receptor de luz 2200 puede tener capacidad de movimiento axial X, Y Z (en otros modos de realización, una platina motorizada o un transportador del sustrato 2201 pueden proporcionar movimiento X, Y Z). El dispositivo receptor de luz 2200 puede incluir accionadores de giro, inclinación y/o locomoción 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 un objetivo 2210 que enfoca la luz entrante.

El dispositivo receptor de luz 2200 se puede seleccionar para captar imágenes en blanco y negro y/o en color. En algunos modos de realización, se pueden usar dos o más dispositivos receptores de luz para dividir el tiempo de procesamiento asociado con la captación de las imágenes. Por ejemplo, una estación de imágenes de bajo aumento puede ir seguida de una estación de imágenes de alto aumento. De forma similar, en algunos modos de realización, el sistema 2000, la plataforma 2100, el ordenador 2300 y/o el dispositivo receptor de luz 2200 pueden ordenar al transportador del sustrato 2201 que traslade el sustrato 2700 para asegurar la captación y almacenamiento de una o más imágenes de todas las células del sustrato o de una parte específica del sustrato, o la mayoría de ellas.

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 programas informáticos almacenado en la memoria o en medios tangibles legibles por ordenador, tal como una unidad óptica. Los programas informáticos pueden incluir instrucciones para provocar que el ordenador haga funcionar el dispositivo receptor de luz 2200, el aplicador 2400, el dispositivo de circulación de gas 2500, la plataforma 2100, el impulsor 2110, la fuente de luz 2600, los dosificadores 2450 y/o 2800, la máquina de preparación de muestras 1 o cualquier componente dentro de uno de estos componentes o conectado al mismo. De forma similar, el ordenador está dispuesto para recibir información de cualquiera de estos componentes.

Por ejemplo, los programas informáticos puede controlar la velocidad de distribución de 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 captadas por el dispositivo receptor de luz 2200. A través del procedimiento de análisis se puede disponer y controlar el ordenador para calcular el número de un tipo específico de células en un volumen determinado de sangre, por ejemplo para recuentos de sangre, glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, y se podrían calcular otros componentes medidos y derivados del hemograma completo tales como: contenido de hemoglobina, morfología de los glóbulos rojos o fórmula leucocitaria. Los programas informáticos de análisis de imágenes pueden 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.

5 En algunos modos de realización, el ordenador 2300 está configurado para mostrar datos numéricos, histogramas de poblaciones celulares, diagramas de dispersión y evaluaciones directas de la morfología celular usando imágenes de los glóbulos sanguíneos mostradas en la pantalla. La capacidad de mostrar la morfología celular proporcionalmente 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 su revisión manual por un técnico experimentado u otro profesional. Los programas informáticos también pueden proporcionar al ordenador instrucciones para mostrar imágenes 2331 recibidas desde el dispositivo receptor de luz o pueden hacer que la pantalla 10 2330 muestre los resultados 2332 (quizá en una tabla o gráfico, por ejemplo) de un análisis de las imágenes. De forma similar, el ordenador 2300 se puede controlar para contar el número de células de un tipo específico en un volumen de sangre determinado o contar el número de células dañadas, células cancerosas o células lisadas en un volumen de sangre determinado. Los programas informáticos permiten que el ordenador realice el proceso de análisis. El ordenador puede usar uno o más aumentos durante el análisis.

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

25 En determinados modos de realización, el aplicador 2400 puede incluir una jeringa, una pipeta manual o accionada por motor, o una bomba controlada por motor conectada a través de un tubo a una punta de pipeta. El aplicador 2400 aplica una muestra al sustrato 2700 de manera controlada. Se divulgan características, atributos y procedimientos ejemplares del uso del aplicador 2400, 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.

30 Una vez que la muestra se ha aplicado al sustrato 2700, la muestra aplicada se procesa usando la máquina 1. La máquina 1 funciona como se describe en el presente documento para aplicar uno o más colorantes, fijadores y/u otras soluciones a la muestra en el sustrato.

35 En algunos modos 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 que no se tocan desde la punta del aplicador 2400. El incremento de la viscosidad del fluido diluido o el tipo o la cantidad de diluyente pueden afectar a la anchura de las posiciones de asentamiento final de los flujos de muestras desde el aplicador. Al seleccionar una distancia entre filas para permitir la variación típica de las muestras de sangre, todas las células se pueden contar en todas las muestras.

40 El dispositivo de movimiento de gas 2500, que puede ser un dispositivo separado como se muestra en la fig. 15, o puede estar incorporado a la máquina 1 como se analiza previamente, puede incluir un ventilador y/o puede incluir otros dispositivos de movimiento de gas, como un compresor o un fuelle, por ejemplo. El dispositivo de movimiento de gas 2500 puede estar conectado directamente al ordenador 2300 o puede estar conectado a través de otro componente tal como la plataforma 2100 o el aplicador 2400. El dispositivo de movimiento de gas empuja el gas (en algunos casos, aire atmosférico) a lo largo del sustrato para controlar la velocidad a la que se secan las sustancias del sustrato. Mover demasiado aire demasiado rápido (es decir, una velocidad demasiado alta del ventilador) a lo largo del sustrato puede provocar que las células de la muestra estallen debido al secado rápido, y demasiado poco aire demasiado lento (es decir, una velocidad del ventilador demasiado baja) a lo largo del sustrato puede provocar que las células se sequen demasiado lentamente y parezcan encoger.

50 El ordenador 2300 puede seleccionar y controlar la cantidad de aire que se traslada a lo largo del sustrato en un período de tiempo (es decir, los pies cúbicos o centímetros cúbicos de aire por segundo) basándose en la distancia del dispositivo de movimiento de gas al sustrato, el tipo de fluido analizado, la anchura de los flujos, la temperatura del gas (por ejemplo, aire) y el grosor promedio de los flujos. El dispositivo de movimiento de gas 2500 se puede situar de modo que el dispositivo dirija el gas de modo que el gas alcance el sustrato en un ángulo de 30°-60° (por ejemplo, 45°) durante un período de aproximadamente 15 a 20 segundos. En algunos modos de realización, el ordenador 2300 puede controlar la configuración de humedad y temperatura en las proximidades del sistema para permitir que el proceso de secado se produzca sin el uso de un dispositivo de movimiento de gas 2500.

60 El dispositivo de emisión de luz 2600, y los diversos componentes del mismo, se describen a modo de ejemplo en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2009/0269799. El dispositivo de emisión de luz 2600 puede generar diversas longitudes de onda de luz y el dispositivo de recepción de luz 2200 puede detectarlas. Por ejemplo, longitudes de onda tales como 415 nm son útiles para obtener una imagen de la hemoglobina solamente para evaluar la morfología y el contenido de hemoglobina de los glóbulos rojos. La luz emitida a 600 nm puede ser útil para

proporcionar imágenes de alto contraste de las plaquetas y los núcleos. Se pueden elegir otras longitudes de onda para discriminar mejor los colores de basófilos, monocitos, linfocitos (todos con tonos de azul), eosinófilos (rojo) y neutrófilos (color neutro).

5 EJEMPLOS

La divulgación se describe adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no están destinados a limitar el alcance de la invención enumerada en las reivindicaciones.

10 Ejemplo 1

La FIG. 16 es un diagrama de flujo 1400 que muestra una serie de etapas ejemplares para procesar una muestra montada en un sustrato. Las etapas del diagrama de flujo 1400 se pueden usar para preparar una muestra biológica para su examen. Aunque la descripción de este proceso se refiere a veces a etapas específicas que tienen intervalos específicos, y/o divulga etapas que tienen lugar en una secuencia específica, esta descripción está prevista únicamente como un ejemplo no limitante. Con referencia a la fig. 16, la máquina 1 está conectada a un sistema de control 5 para ordenar el funcionamiento de diversos componentes de la máquina durante las etapas de procesamiento. En una etapa de iniciación de la muestra, una muestra biológica 3 que incluye glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas de una alícuota de sangre se aplica a un sustrato 2 que consiste en un portaobjetos de vidrio. Esto se puede realizar usando una estación diferente, tal como una o más de las estaciones descritas en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2008/0102006. En una etapa de posicionamiento 1402, el sustrato 2 que contiene la muestra 3 se carga sobre el portador del sustrato 20A del brazo del sustrato 10A como 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 del portador del sustrato 20A. La succión aplicada a través de los puertos de succión 21 y 22 (etapa 1406) adhiere el sustrato 2 al portador del sustrato 20A durante el procesamiento de muestras. El sistema de control 5 da instrucciones (etapa 1408) al accionador 30A para que gire el sustrato 3 desde una posición abierta que se muestra en la fig. 1 a una posición de procesamiento de muestras que se muestra en la fig. 3A. En la posición de procesamiento de muestras, la muestra 3 está orientada hacia la superficie de la plataforma 60A mientras el sustrato 2 descansa contra los vástagos 70A-D que se muestran en la fig. 2. Los vástagos evitan que el sustrato 2 entre en contacto con la superficie de la plataforma 60A. En este procedimiento de ejemplo, la separación 92 entre la superficie del sustrato 2 que contiene la muestra y la superficie de la plataforma 60A es de aproximadamente 100 micrómetros.

Durante la fase de fijación (etapa 1412, véase también la fig. 10), una bomba aplica fijador a la muestra 3 en la etapa 1414. La bomba 200A conectada al tubo de fluido 54A que se muestra en la fig. 2 propulsa el fijador que comprende metanol desde un depósito de fijador 210 a través del tubo 54A, por el puerto 44A, sobre la plataforma 60A, sobre el sustrato 2 que contiene la muestra 3 y a la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2. La bomba 200A impulsa metanol desde el puerto 44A a un 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 ordenando al accionador 30A (etapa 1418) que eleve el borde próximo del sustrato 2 verticalmente a una distancia de 35 micrómetros desde la posición de procesamiento de muestras y devuelva el sustrato a su posición de procesamiento de muestras. 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, como 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 344 mbar (cinco psi) negativos durante un segundo y medio, T3, evacuando cualquier metanol residual (etapa 1422) presente en la separación, en la plataforma o en el sustrato por medio de los puertos 40A y 41A y los tubos de residuos 50A y 51A. El metanol evacuado se recoge en un recipiente de residuos 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 ordena a la máquina 1 que tiña la muestra (etapa 1426). En referencia a la fig. 2 y al diagrama de flujo de la fig. 11, la bomba 201 conectada al tubo de fluido 52A impulsa tinte de fluoresceína desde un depósito de colorante 211A por el puerto 42A, sobre la plataforma 60A, sobre el sustrato 2 que contiene la muestra 3, y a la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2. La bomba 201 dosifica tinte de fluoresceína a través del puerto 42A a 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 tinte de fluoresceína a la muestra 3, la máquina 1 realiza una segunda etapa de agitación 1428 ordenando al accionador 30A que eleve, en la etapa 1430, el borde próximo del sustrato 2 verticalmente a una distancia de 35 micrómetros desde la posición de procesamiento de muestras y a continuación devuelva el sustrato a su posición de procesamiento de muestras. El sistema de control 5 provoca 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, como se muestra en la fig. 17.

A continuación, se inicia una segunda fase de vacío o evacuación en la etapa 1432. Se aplica un vacío de 344 mbar

(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 en el sustrato por medio de los puertos 40A y/o 41A y los tubos de residuos 50A y 51A. El tinte de fluoresceína evacuado se recoge en un recipiente de residuos 230A y/o 231A.

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

Después de aplicar colorante a la muestra 3, la máquina 1 inicia una tercera fase de agitación en la etapa 1440 ordenando al accionador 30A que eleve el borde próximo del sustrato 2 (etapa 1442) a una distancia de 35 micrómetros desde la posición de procesamiento de muestras y a continuación devuelva el sustrato que contiene la muestra 3 a su posición de procesamiento de muestras. 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.

15

Se inicia a continuación una tercera etapa de vacío o evacuación 1444. Se aplica un vacío de 344,7 mbar (cinco psi) negativos durante dos segundos, T9, para evacuar el tinte de tiacina residual en la etapa 1446 presente en la separación o en la plataforma 60A y en el sustrato 2 por medio de los puertos 40A y/o 41A y los tubos de residuos 50A y/o 51A, después de la agitación. El tinte de tiacina evacuado se recoge en un recipiente de residuos 230A y/o 231A.

20

La máquina 1 realiza a continuación dos secuencias de las fases de enjuague-agitación-vacío. 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 enjuague. Un depósito 213A que contiene solución de enjuague de agua destilada está conectado a una bomba 203 y al tubo de fluido 55A. La bomba 203 dirige agua destilada a través del tubo de lavado 55A que alimenta al puerto 45A, a la separación 92 y sobre la plataforma 60A y el sustrato 2 para enjuagar la muestra 3 en la etapa 1450. De forma alternativa, en algunos modos de realización, el fluido de lavado se dirige a través de dos o más de los puertos de fluido 42A a 45A. La bomba 203 dirige agua destilada por los puertos 45A a 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.

25
30

A continuación, el sistema de control 5 inicia una cuarta fase de agitación en la etapa 1452, ordenando al accionador 30A (etapa 1454) que eleve el borde próximo del sustrato 2 verticalmente a una distancia de 35 micrómetros desde la posición de procesamiento de muestras y devuelva el sustrato a su posición de procesamiento de muestras. El sistema de control 5 puede ordenar a la máquina 1 que repita esta fase de agitación y complete las dos agitaciones en aproximadamente cuatro segundos, T11.

35

A continuación, se inicia una fase de vacío o evacuación en la etapa 1456. Un vacío de 344,7 mbar (cinco psi) aplicado durante cinco segundos y medio, T12, en la etapa 1458, evacua el agua destilada residual presente en la separación 92 o en la plataforma 60A y en el sustrato 2 por medio de los puertos 40A y/o 41A y los tubos de residuos 50A y/o 51A después de la agitación.

40

Después de esto, en la etapa 1460, el sistema de control 5 ordena a la máquina 1 que comience la segunda secuencia de fases de enjuague-agitación-vacío iniciando una segunda fase de enjuague. Una segunda fase de enjuague (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 divulga anteriormente para la primera fase de enjuague-agitación-vacío. Durante la segunda fase de enjuague-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 fases de enjuague-agitación-vacío.

45
50

Después de que la muestra se haya fijado, teñido con colorantes de fluoresceína y tiacina, y enjuagada, la máquina 1 inicia una fase de secado en la etapa 1472. El secador 4 dirige un flujo de aire de aproximadamente 120° a un caudal de 10 litros por minuto (etapa 1474) durante un período de ocho segundos, T16, a lo largo de la muestra.

55

Después de completar estas etapas, el sustrato 2 regresa a su posición original en la etapa 1476. En esta etapa, el accionador 30A gira el sustrato 2 desde la posición de procesamiento de muestras hasta la posición abierta como se representa en la fig. 1. A continuación se puede retirar el sustrato 2 mediante un transportador del sustrato, y se puede cargar un nuevo sustrato para procesar una nueva muestra.

60

Ejemplo 2

Las etapas de procesamiento descritas anteriormente para el ejemplo 1 se pueden ajustar en otros modos de realización de la invención como sigue. Además, las formulaciones de solución de fijador, colorantes y enjuague divulgadas en la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/505.011 se pueden usar en las siguientes etapas de procesamiento de ejemplo.

65

- 5 Durante una primera fase de fijación (etapa 1412, véase también la fig. 10), una bomba aplica una solución fijadora a la muestra 3 en la etapa 1414. La bomba 200A conectada al tubo de fluido 54A que se muestra en la fig. 2 impulsa una solución fijadora que comprende metanol desde un depósito de fijador 210 a través del tubo 54A, por el puerto 44A, sobre la plataforma 60A, sobre el sustrato 2 y a la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2. La bomba 200A impulsa la solución fijadora desde el puerto 44A a un caudal de 115 microlitros por segundo durante un período T1 de dos segundos, dirigiendo de este modo un total de 230 microlitros de la solución fijadora, V1, sobre el sustrato 2.
- 10 A continuación, en una primera etapa de agitación 1416, el sistema de control 5 agita el sustrato ordenando al accionador 30A (etapa 1418) que eleve el borde próximo del sustrato 2 verticalmente a una distancia de 35 micrómetros desde la posición de procesamiento de muestras y devuelva la muestra a su posición de procesamiento de muestras. 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
- 15 etapa de vacío 1420. Se aplica una fuerza de vacío de 413,7 mbar (seis psi) negativos durante un segundo y medio, T3, evacuando cualquier solución fijadora residual (etapa 1422) presente en la separación, en la plataforma o en el sustrato por medio de los puertos 40A y 41A y los tubos de residuos 50A y 51A. La solución fijadora evacuada se recoge en un recipiente de residuos 230 y/o 231.
- 20 Después de esto, en una segunda fase de fijación que incluye una segunda etapa de agitación, se repiten las etapas anteriores de la primera fase de fijación y la primera etapa de agitación.
- 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 ordena a la máquina 1 que tiña la muestra (etapa 1426). En referencia a la fig. 2 y al diagrama de
- 25 flujo de la fig. 11, la bomba 201 conectada al tubo de fluido 52A impulsa una primera solución de colorante que comprende eosina Y desde un depósito de colorante 211A por el puerto 42A, sobre la plataforma 60A, sobre el sustrato 2 que incluye la muestra 3, y a la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2. La bomba 201 dosifica la primera solución de colorante a través del puerto 42A a 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.
- 30 Después de aplicar una primera solución de colorante a la muestra 3, la máquina 1 realiza una segunda etapa de agitación 1428 ordenando al accionador 30A que eleve, en la etapa 1430, el borde próximo del sustrato 2 verticalmente a una distancia de 35 micrómetros desde la posición de procesamiento de muestras y a continuación devuelva la muestra a su posición de procesamiento de muestras. El sistema de control 5 provoca que la máquina 1 repita esta
- 35 etapa de agitación dos veces más y complete las tres agitaciones durante un período de aproximadamente seis segundos, T5, como se muestra en la fig. 17.
- A continuación, se inicia una segunda fase de vacío en la etapa 1432. Se aplica un vacío de 344 mbar (cinco psi) negativos durante tres segundos, T6, en la etapa 1434 para evacuar cualquier primera solución de colorante residual presente en la separación 92 o en la plataforma y en el sustrato por medio de los puertos 40A y/o 41A y los tubos de
- 40 residuos 50A y 51A. La primera solución de colorante evacuada se recoge en un recipiente de residuos 230A y/o 231A.
- 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 usando una segunda solución de colorante que incluye azul B y azul de metileno. La
- 45 bomba 202 conectada al tubo de fluido 53A impulsa la segunda solución de colorantes desde un depósito de colorante a través del puerto 43A, sobre la plataforma 60A, sobre el sustrato 2, y a la separación 92 entre la plataforma 60A y el sustrato 2 (etapa 1438). La máquina 1 dosifica la segunda solución de colorante a través del puerto 43A a 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.
- 50 Después de aplicar el colorante a la muestra 3, la máquina 1 inicia una tercera fase de agitación en la etapa 1440 ordenando al accionador 30A que eleve el borde próximo del sustrato 2 (etapa 1442) a una distancia de 35 micrómetros desde la posición de procesamiento de muestras y a continuación devuelva la muestra 3 a su posición de procesamiento de muestras. La máquina 1 repite esta etapa de agitación dos veces más. La máquina completa los
- 55 tres movimientos de agitación durante un período de aproximadamente seis segundos, T8.
- Se inicia a continuación una tercera etapa de vacío 1444. Se aplica un vacío de 413 mbar (seis psi) negativos durante dos segundos, T9, para evacuar la segunda solución de colorante residual en la etapa 1446 presente en la separación o en la plataforma 60A y en el sustrato 2 por medio de los puertos 40A y/o 41A y los tubos de residuos 50A y/o 51A,
- 60 después de la agitación. La segunda solución de colorante evacuada se recoge en un recipiente de residuos 230A y/o 231A.
- La máquina 1 realiza a continuación dos secuencias de las fases de enjuague-agitación-vacío. 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
- 65 primera fase de enjuague. Un depósito 213A que contiene una solución de enjuague está conectado a una bomba 203 y al tubo de fluido 55A. La bomba 203 dirige la solución de enjuague a través del tubo de lavado 55A que alimenta

al puerto 45A, a la separación 92 y sobre la plataforma 60A y el sustrato 2 para enjuagar la muestra 3 en la etapa 1450. De forma alternativa, en algunos modos de realización, la solución de enjuague se dirige a través de dos o más de los puertos de fluido 42A a 45A. La bomba 203 dirige la solución de enjuague por los puertos 45A a 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, ordenando al accionador 30A (etapa 1454) que eleve el borde próximo del sustrato 2 verticalmente a una distancia de 35 micrómetros desde la posición de procesamiento de muestras y devuelva la muestra a su posición de procesamiento de muestras. El sistema de control 5 ordena a continuación a la máquina 1 que repita esta fase de agitación y complete las cuatro agitaciones en aproximadamente ocho segundos, T11.

A continuación, se inicia una fase de vacío en la etapa 1456. Un vacío de 344,7 mbar (cinco psi) aplicado durante cinco segundos y medio, T12, en la etapa 1458, evacua la solución de enjuague residual presente en la separación 92 o en la plataforma 60A y en el sustrato 2 por medio de los puertos 40A y/o 41A y los tubos de residuos 50A y/o 51A después de la agitación.

Después de esto, en la etapa 1460, el sistema de control 5 ordena a la máquina 1 que comience la segunda secuencia de fases de enjuague-agitación-vacío iniciando una segunda fase de enjuague. Una segunda fase de enjuague (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 divulga anteriormente para la primera fase de enjuague-agitación-vacío. Durante la segunda fase de enjuague-agitación-vacío, la cantidad de solución de enjuague, V5, y los tiempos de procesamiento T13, T14 y T15 son generalmente los mismos que en la primera secuencia de fases de enjuague-agitación-vacío. Además, inmediatamente antes de la fase de vacío, el accionador 30A eleva el borde próximo del sustrato 2 a una distancia de 15-35 micrómetros desde la posición de procesamiento de muestras. Esta separación incrementada entre el sustrato 2 y la plataforma 60 mejora la evacuación de cualquier fluido residual en la separación 92 durante la fase final de vacío.

Después de que la muestra haya sido fijada, teñida con una primera solución de colorante que contiene eosina Y y una segunda solución de colorante que contiene azur B y azul de metileno, y enjuagada, la máquina 1 inicia una fase de secado en la etapa 1472. El secador 4 dirige un flujo de aire de aproximadamente 120° a un caudal de 10 litros por minuto (etapa 1474) durante un período de ocho segundos, T16, a lo largo de la muestra.

Después de completar estas etapas, el sustrato 2 regresa a su posición original en la etapa 1476. En esta etapa, el accionador 30A gira el sustrato 2 desde la posición de procesamiento de muestras hasta la posición abierta como se representa en la fig. 7. A continuación se puede retirar el sustrato 2 mediante un transportador del sustrato, y se puede cargar un nuevo sustrato para procesar una nueva muestra.

Como se ilustra en las etapas de procesamiento de muestras de ejemplo descritas anteriormente, los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento proporcionan un procesamiento de muestras más eficaz al consumir menos reactivos en comparación con los procedimientos convencionales de procesamiento de muestras incluyendo las técnicas automatizadas y manuales de preparación de muestras. En referencia al ejemplo 2, la máquina 1 consumió menos de un mililitro y medio de reactivos para fijar, teñir y enjuagar la muestra durante las etapas de procesamiento ejemplares (por ejemplo, 460 microlitros de solución fijadora + 230 microlitros de primera solución de colorante + 230 microlitros de segunda solución de colorante + 460 microlitros de solución de enjuague = 1380 microlitros de reactivos). En algunos modos de realización se pueden usar más o menos de 1380 microlitros de fluidos durante el procesamiento de muestras. Por ejemplo, la cantidad de fluido usada en el procesamiento de una muestra puede ser de aproximadamente 1150 microlitros (por ejemplo, eliminando una de las fases de enjuague) o menos de 1,000 microlitros (por ejemplo, eliminando además una de las fases de fijación).

Con respecto a la fig. 17, para el ejemplo 1, la máquina 1 consumió menos de un mililitro de reactivos para fijar, teñir y enjuagar la muestra durante las etapas de procesamiento ejemplares (por ejemplo, 140 microlitros de fijador de metanol + 140 microlitros de tinte de fluoresceína + 140 microlitros de tinte de tiacina + 280 microlitros de solución de enjuague = 700 microlitros de reactivos). En algunos modos de realización se pueden usar más o menos de 700 microlitros de fluidos durante el procesamiento de muestras. Por ejemplo, la cantidad de fluido usada en el procesamiento de una muestra puede ser de aproximadamente 560 microlitros (por ejemplo, eliminando una de las fases de enjuague).

En general, el volumen total de fluidos consumido 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, 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).

En referencia a la fig. 17 y el ejemplo 1, el procedimiento de preparación de la muestra se completa en algo 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 tiacina + 23 segundos

5 transcurridos durante las fases de enjuague + 8 segundos transcurridos durante la fase de secado = 67,5 segundos de tiempo total transcurrido). En determinados modos de realización, la preparación de muestras se puede completar en más, como en el ejemplo 2, o en menos de 67,5 segundos. Por ejemplo, el procesamiento de muestras 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).

10 Además, mientras el proceso ejemplar anterior describe el tiempo de procesamiento para una sola muestra, los sistemas y procedimientos para procesar múltiples sustratos (por ejemplo, la máquina 1 de la fig. 1, configurada para procesar dos sustratos, y/o sistemas configurados para procesar tres o más sustratos) pueden procesar más de 100 muestras por hora (por ejemplo, entre 60 muestras y 120 muestras por hora). El uso de los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento en entornos de laboratorio puede dar como resultado un rendimiento más rápido por muestra, mientras que el consumo de fluidos (por ejemplo, fluidos fijadores, colorantes y de enjuague) se reduce en comparación con los sistemas automatizados convencionales y las técnicas de preparación manual de muestras.

15

OTROS MODOS DE REALIZACIÓN

20 Se debe entender que, aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la divulgación, 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 (3) sobre un sustrato (2) para su examen, comprendiendo el aparato:
- 5 un brazo de sustrato (10A, 10B) que incluye un portador de sustrato (20A, 20B);
- un accionador (30A, 30B) conectado al brazo de sustrato (10A, 10B) y configurado para mover el brazo de sustrato (10A, 10B) entre una posición abierta y una posición de procesamiento de muestras;
- 10 una plataforma (60A, 60B) que tiene una superficie superior situada opuesta al sustrato (2) cuando el brazo de sustrato (10A, 10B) está en la posición de procesamiento de muestras y que comprende al menos un puerto de fluido (42A-45A) situado en una superficie de la plataforma (60A, 60B) frente al sustrato (2) y al menos un puerto de vacío (40A, 40B, 41A) situado en la superficie de la plataforma (60A, 60B) frente al sustrato (2); y
- 15 dos o más vástagos (70A, 70B) dispuestos en la superficie superior de la plataforma (60A, 60B), de modo que cuando el sustrato (2) se pone en contacto con todos los vástagos (70A, 70B) en la posición de procesamiento del sustrato, el sustrato (2) y la superficie superior de la plataforma (60A, 60B) están sustancialmente paralelos y forman una separación de al menos aproximadamente 50 micrómetros,
- 20 en el que, durante el funcionamiento, el aparato está configurado para hacer circular fluido entre el al menos un puerto de fluido (42A-45A) y el al menos un puerto de vacío (40A, 40B, 41A):
- (a) dosificando una primera cantidad de fluido desde el al menos un puerto de fluido (42A-45A) para llenar la separación entre el sustrato y la plataforma;
- 25 (b) dosificando múltiples cantidades adicionales de fluido desde el al menos un puerto de fluido (42A-45A) a la separación para desplazar partes de fluido desde la separación; y
- (c) retirando las partes desplazadas de fluido a través del al menos un puerto de vacío (40A, 40B, 41A); y
- 30 en el que el aparato comprende además un medio para controlar la dosificación y retirada de fluido que está configurado para dosificar de forma alternativa las múltiples cantidades adicionales de fluido y retirar las partes desplazadas de fluido para generar un flujo pulsátil de fluido entre el al menos un puerto de fluido (42A -45A) y el al menos un puerto de vacío (40A, 40B, 41A).
- 35 2. El aparato de la reivindicación 1, en el que las múltiples cantidades adicionales de fluido comprenden al menos 4 cantidades adicionales de fluido.
3. El aparato de la reivindicación 1, en el que el aparato está configurado para dosificar las múltiples cantidades adicionales de fluido desde el al menos un puerto de fluido (42A-45A) a un caudal de 20 microlitros por segundo o más.
4. El aparato de la reivindicación 1, en el que el aparato está configurado para dosificar las múltiples cantidades adicionales de fluido desde el al menos un puerto de fluido (42A-45A) a un caudal de 250 microlitros por segundo o menos.
- 45 5. El aparato de la reivindicación 1, en el que la plataforma (60A, 60B) está orientada de modo que el al menos un puerto de fluido (42A-45A) está inclinado hacia arriba en un ángulo de 3 grados o más con respecto a dicho al menos un puerto de vacío (40A, 40B, 41A).
- 50 6. El aparato de la reivindicación 1, en el que la plataforma (60A, 60B) está orientada de modo que el al menos un puerto de fluido (42A-45A) está inclinado hacia arriba en un ángulo de 20 grados o más con respecto a dicho al menos un puerto de vacío (40A, 40B, 41A).
- 55 7. El aparato de la reivindicación 1, en el que el aparato está configurado para hacer circular fluido entre el al menos un puerto de fluido (42A-45A) y el al menos un puerto de vacío (40A, 40B, 41A) sin cambiar la separación entre el sustrato (2) y la superficie superior de la plataforma (60A, 60B).
- 60 8. El aparato de la reivindicación 1, en el que el al menos un puerto de fluido (42A-45A) comprende un primer puerto de colorante, y en el que el aparato comprende además un primer depósito de colorante (211A) y un primer conducto de colorante conectado al primer puerto de colorante de modo que durante el funcionamiento, se puede dosificar fluido que comprende un primer colorante desde el primer depósito de colorante (211A) a través del primer puerto de colorante y a la separación.
- 65 9. El aparato de la reivindicación 1, en el que el al menos un puerto de fluido (42A-45A) comprende un puerto de fijador, y en el que el aparato comprende además un depósito de fijador (210) y un conducto de fijador conectado al puerto

de fijador de modo que durante el funcionamiento, se puede dosificar fluido que comprende un fijador desde el depósito de fijador (210) a través del puerto de fijador y a la separación.

5 10. El aparato de la reivindicación 1, en el que el brazo del sustrato (10A, 10B) es un primer brazo del sustrato y el portador del sustrato (20A, 20B) es un primer portador del sustrato, comprendiendo además el aparato:

un segundo brazo del sustrato que incluye un segundo portador del sustrato; y

10 un mecanismo de traslado configurado para trasladar el aparato entre al menos dos posiciones, en el que, en una primera de las posiciones, el primer portador del sustrato está situado para recuperar un sustrato de un transportador del sustrato, y en una segunda de las posiciones, el segundo portador del sustrato está situado para recuperar un sustrato del transportador del sustrato.

15 11. El aparato de la reivindicación 10, que comprende además un sistema de control conectado al mecanismo de traslado, en el que el sistema de control está configurado de modo que durante el funcionamiento del aparato, el sistema de control activa el mecanismo de traslado de modo que:

20 cuando un sustrato (2) está sujeto al segundo portador del sustrato y el segundo brazo del sustrato está en la posición abierta, en la posición de procesamiento de muestras, o en una posición intermedia entre la posición abierta y la posición de procesamiento de muestras, el primer portador del sustrato está situado para recuperar un sustrato del transportador del sustrato; y

25 cuando un sustrato está sujeto al primer portador del sustrato y el primer brazo del sustrato está en la posición abierta, en la posición de procesamiento de muestras, o en una posición intermedia entre la posición abierta y la posición de procesamiento de muestras, el segundo portador del sustrato está situado para recuperar un sustrato del transportador del sustrato.

30 12. Un procedimiento para preparar una muestra biológica (3) en un sustrato (2) para su examen, comprendiendo el procedimiento:

(a) situar el sustrato (2) con respecto a una superficie de modo que la muestra biológica (3) se oriente hacia la superficie, y de modo que el sustrato (2) y la superficie estén sustancialmente paralelos y formen una separación de al menos aproximadamente 50 micrómetros;

35 (b) dosificar secuencialmente una primera cantidad de (i) una primera solución fijadora, (ii) una primera solución de colorante, (iii) una segunda solución de colorante y (iv) una primera solución de enjuague a la separación entre el sustrato y la superficie en cantidad suficiente para llenar la separación; y

40 (c) después de dosificar la primera cantidad de cada una de las soluciones (i), (ii), (iii) y (iv) en la etapa (b), y antes de dosificar la siguiente de las soluciones (i), (ii), (iii) y (iv) en la etapa (b):

dosificar múltiples cantidades adicionales de la solución a la separación para desplazar partes de fluido de la separación; y

45 retirar las partes de fluido desplazadas a través de al menos un puerto de vacío (40A, 40B, 41A),

en el que las cantidades adicionales de la solución y las partes desplazadas del fluido se dosifican y retiran de forma alternativa para generar un flujo pulsátil de solución dentro de la separación.

50 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que las múltiples cantidades adicionales de la solución comprenden al menos 2 cantidades adicionales de la solución.

14. El procedimiento de la reivindicación 12, que comprende además dosificar las cantidades adicionales de la solución a la separación a un caudal de entre 20 microlitros por segundo y 250 microlitros por segundo.

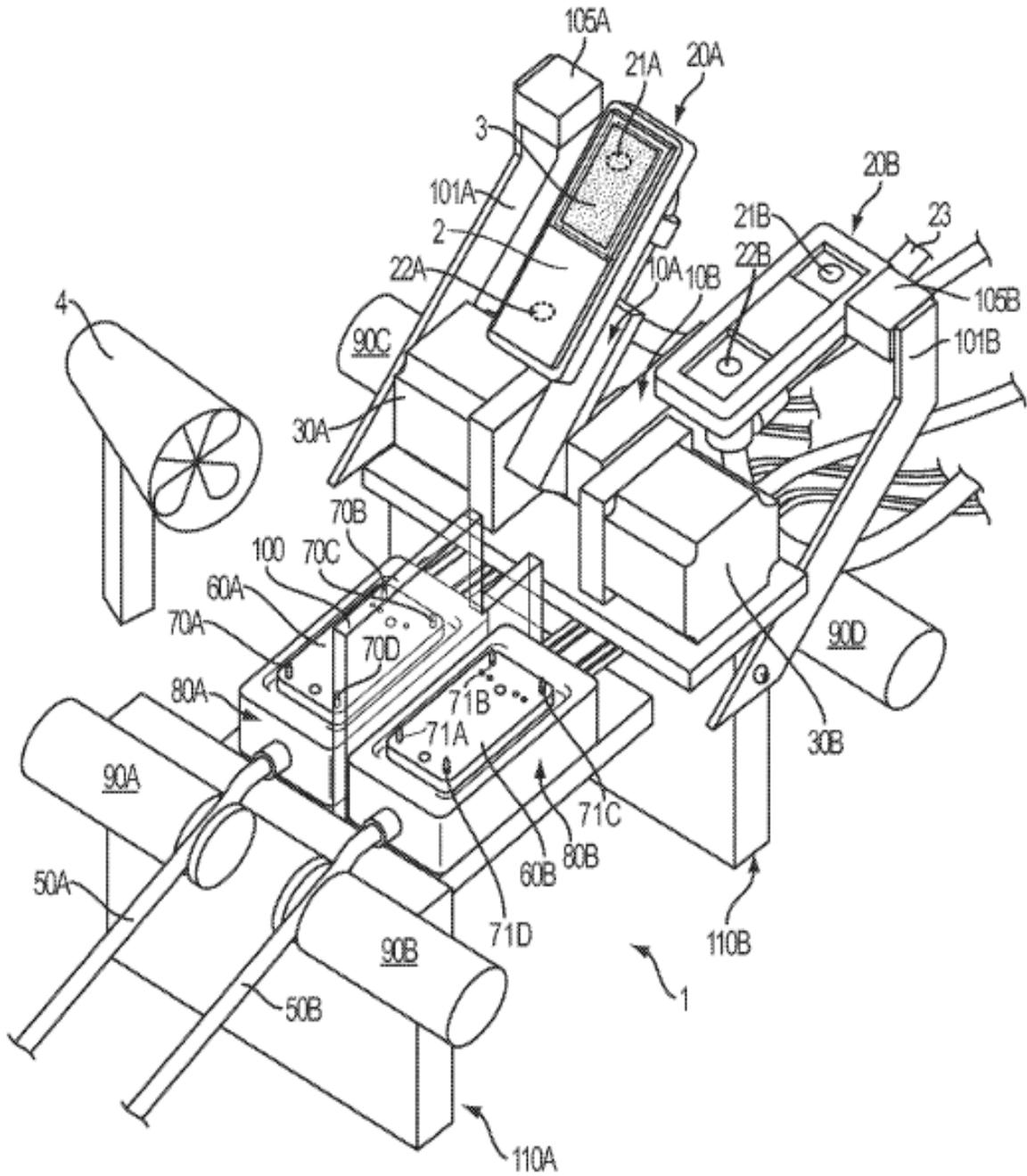


FIG. 1

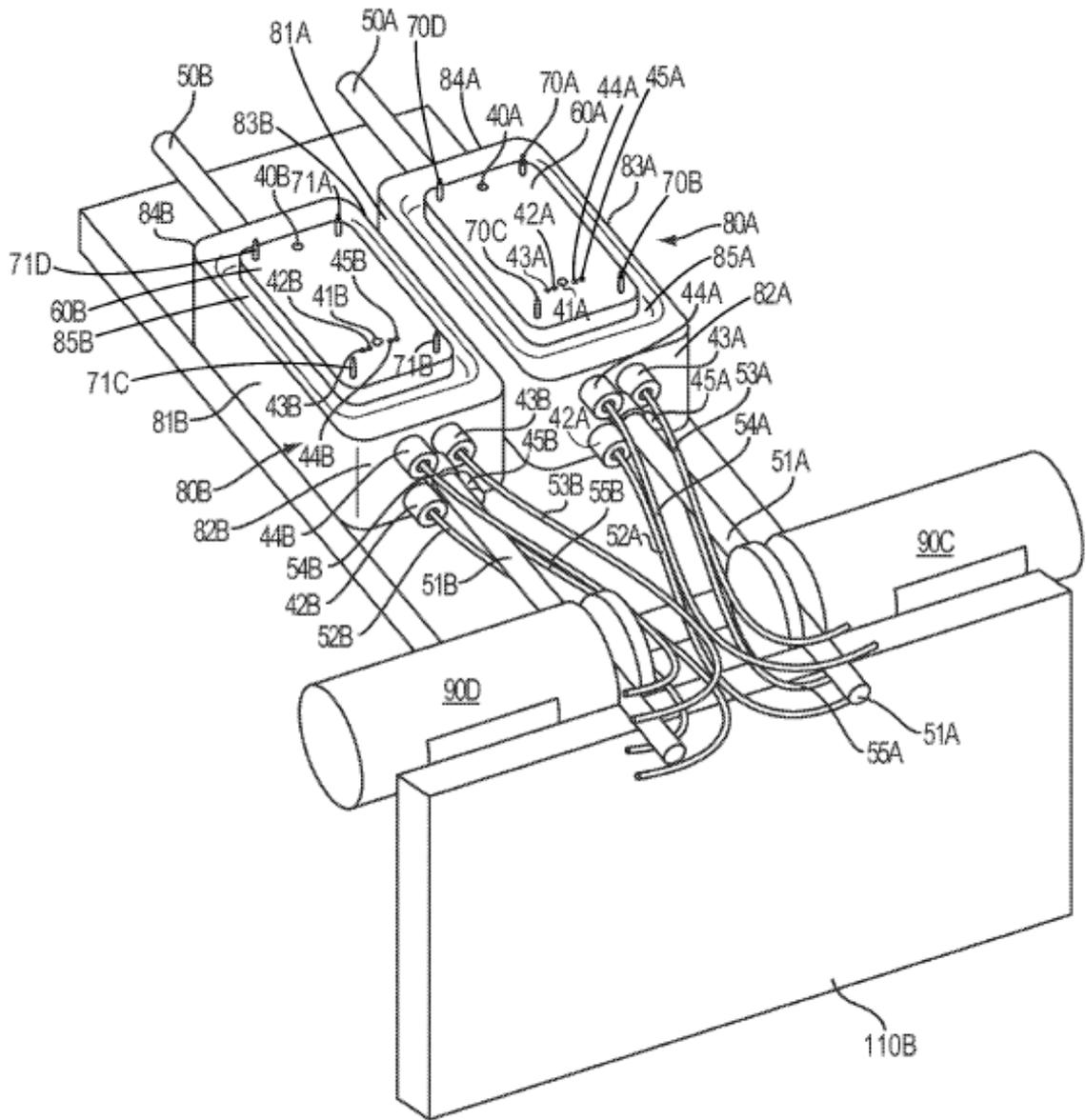


FIG. 2

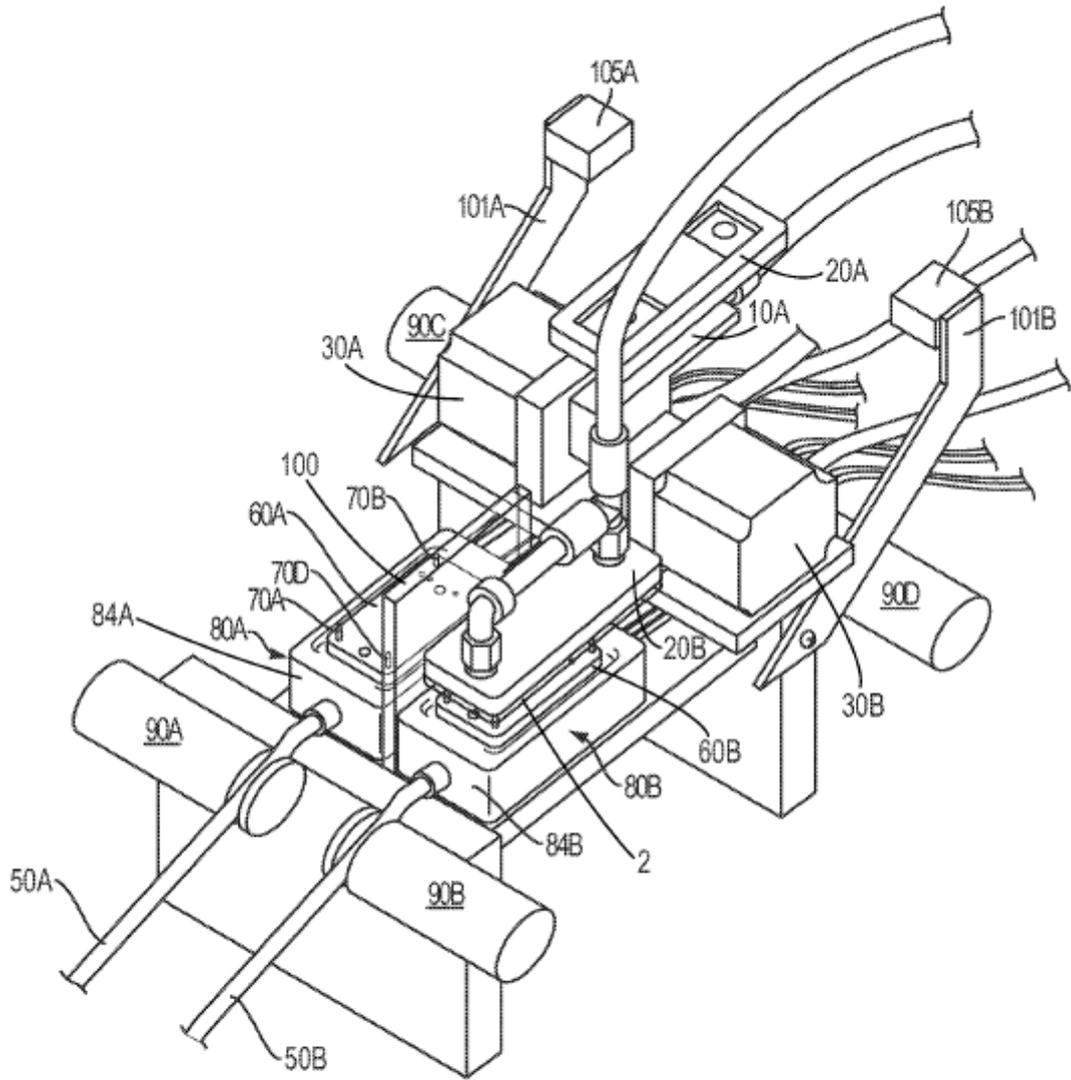


FIG. 3A

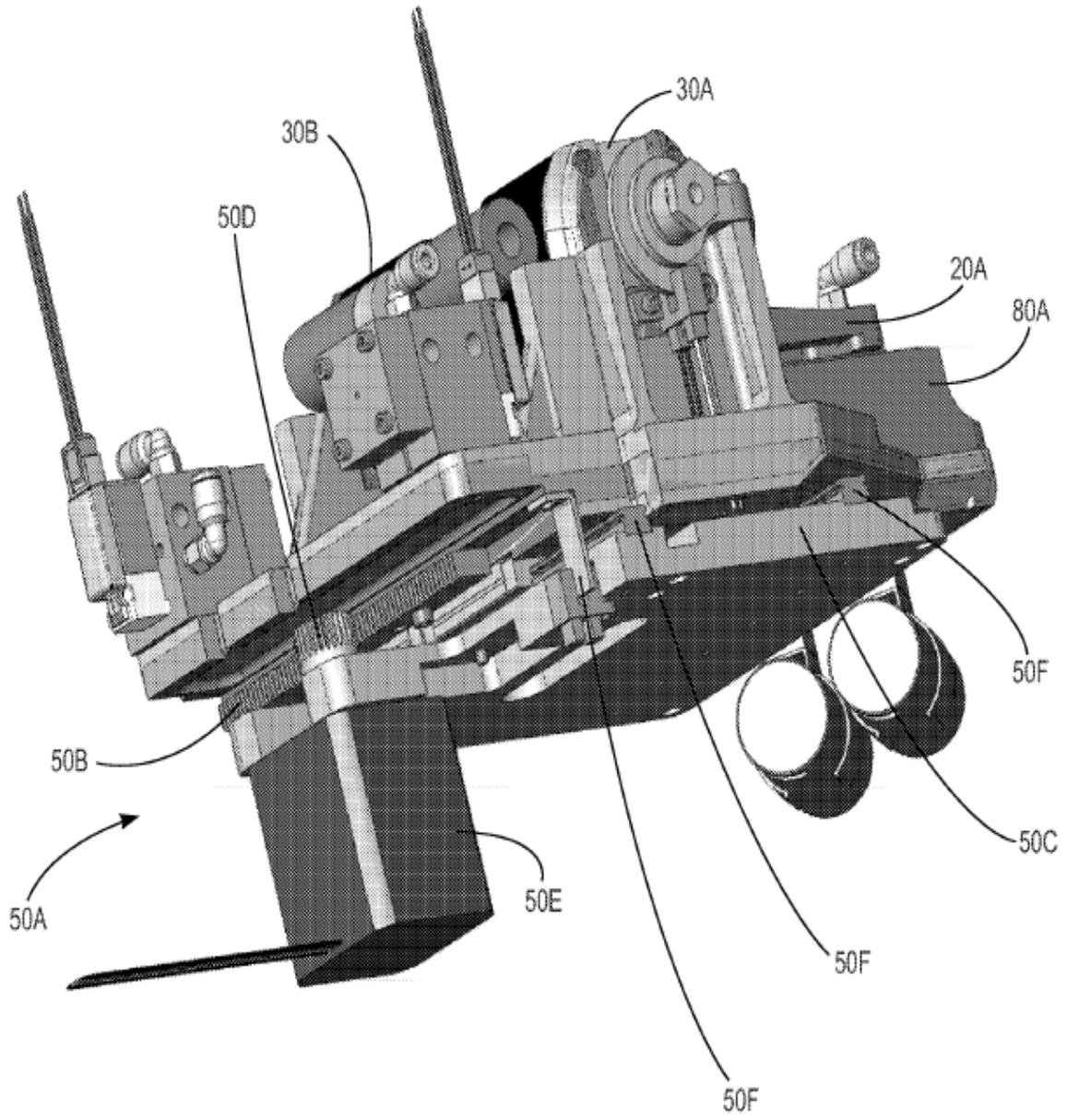


FIG. 3B

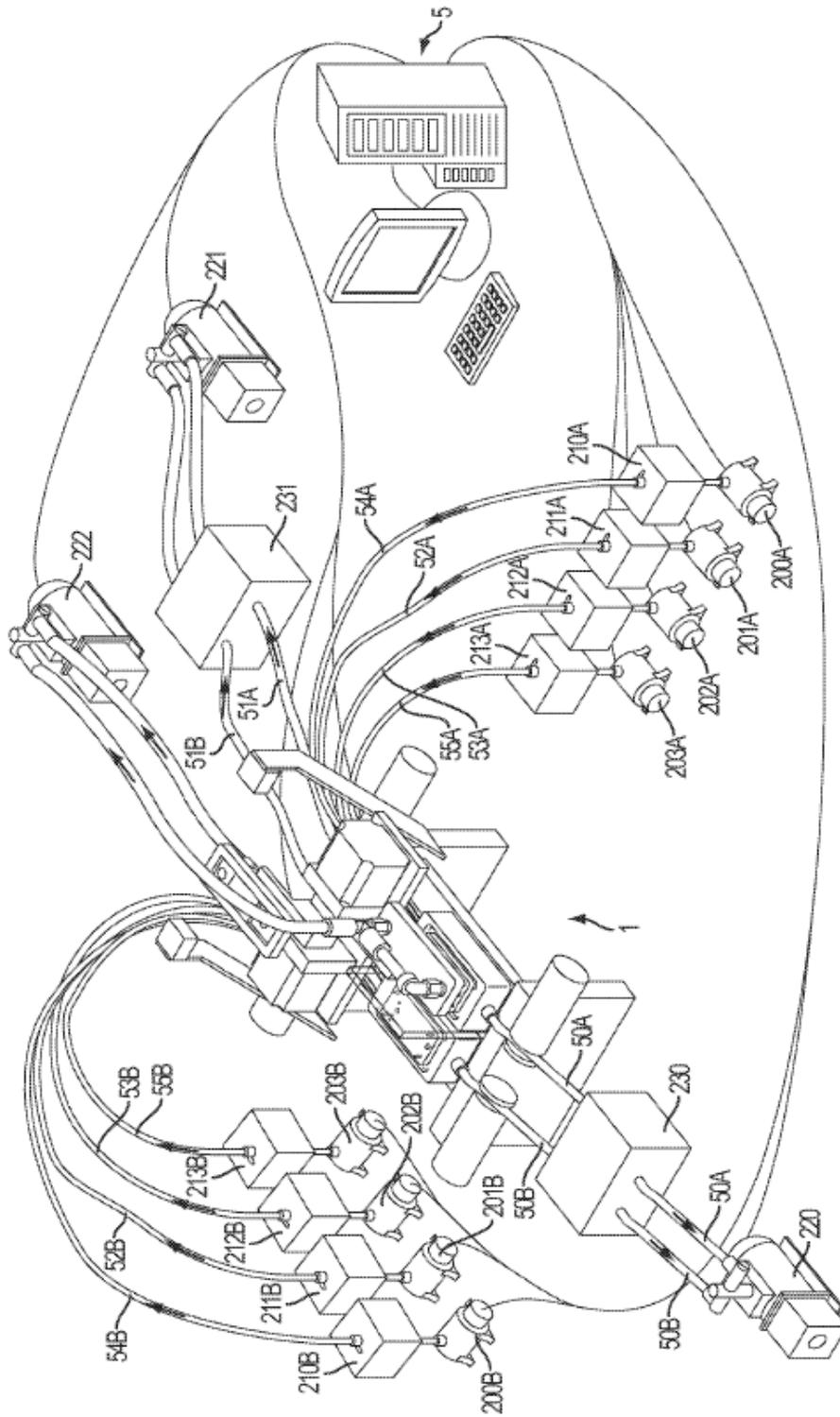


FIG.4

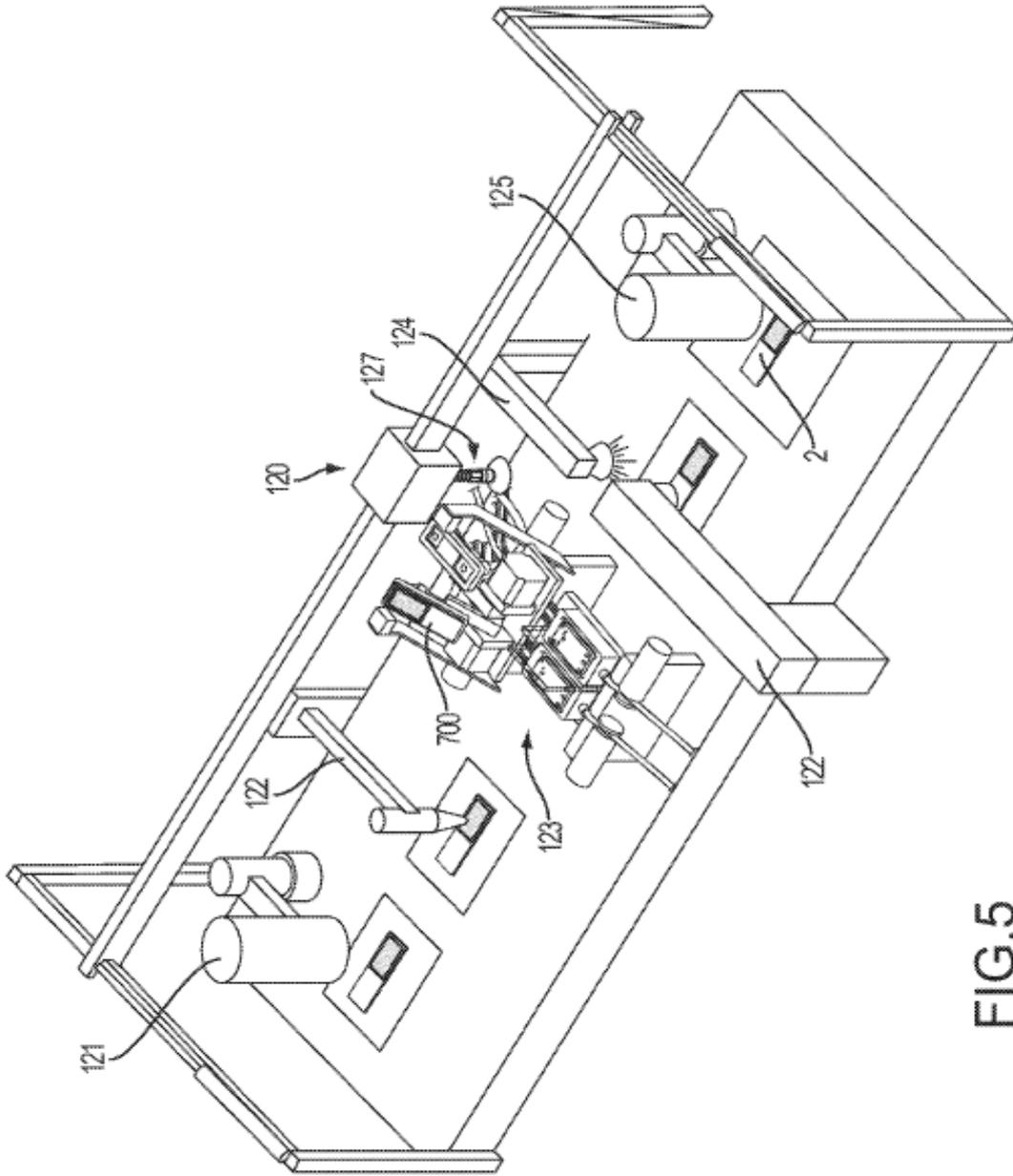


FIG.5

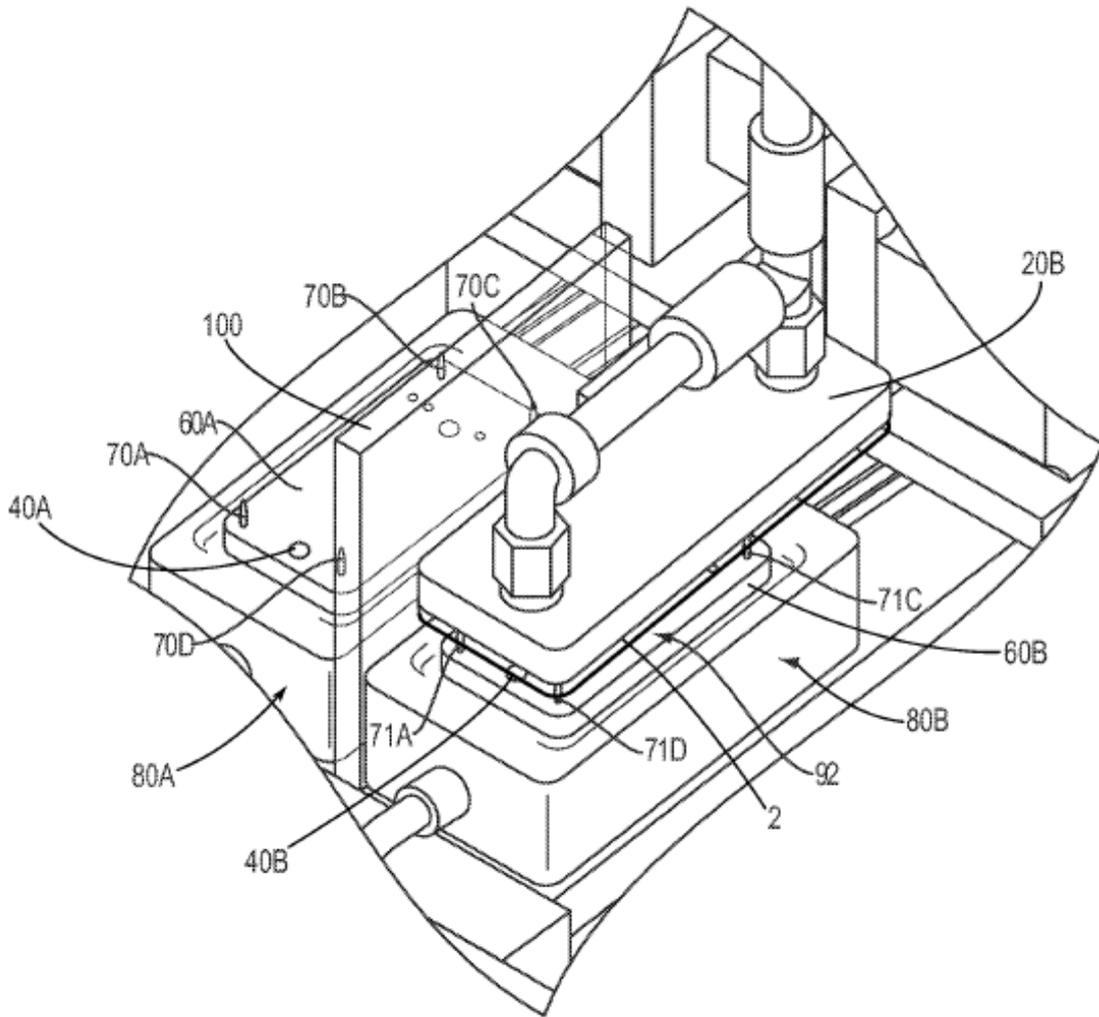


FIG. 6A

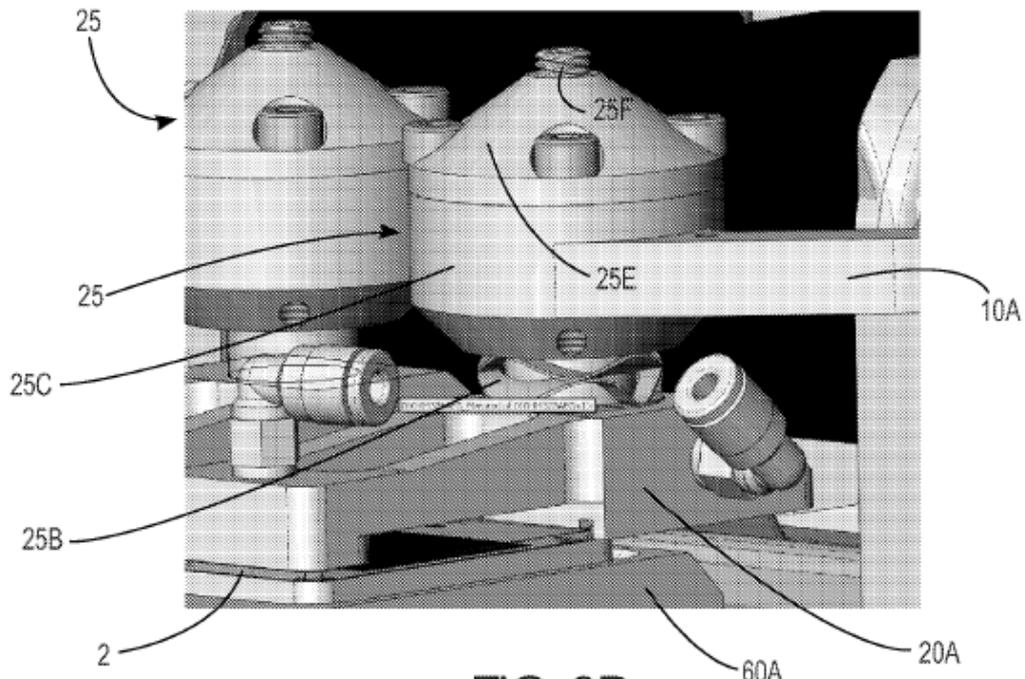


FIG. 6B

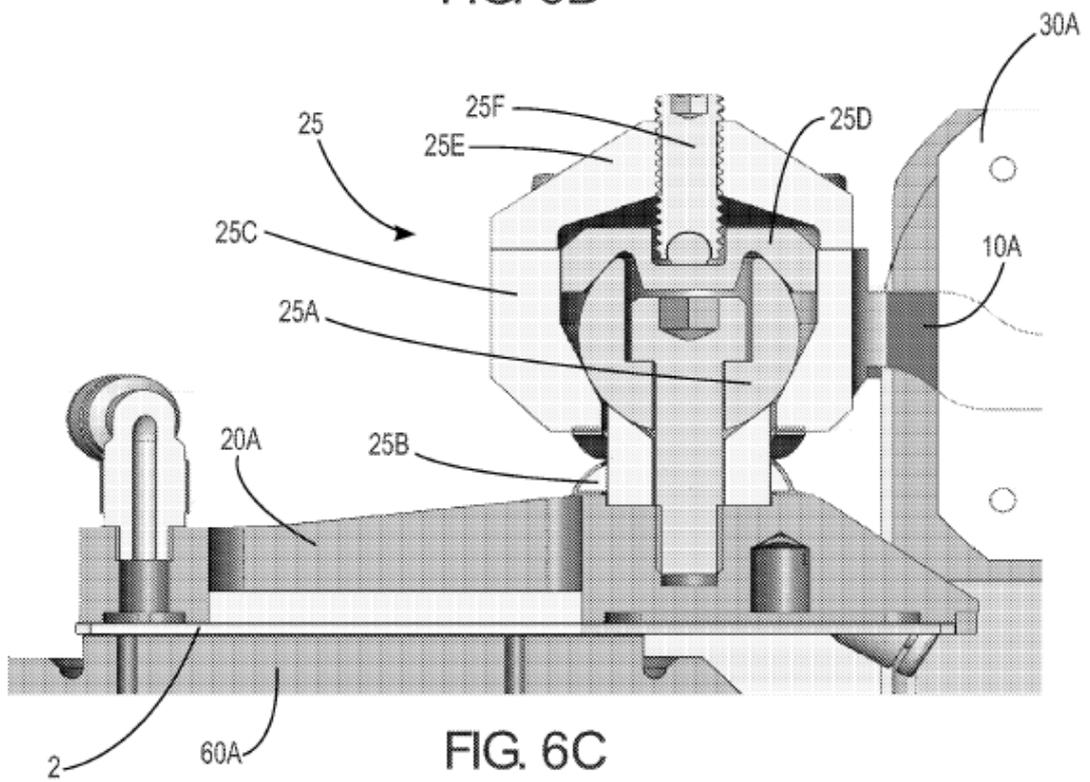


FIG. 6C

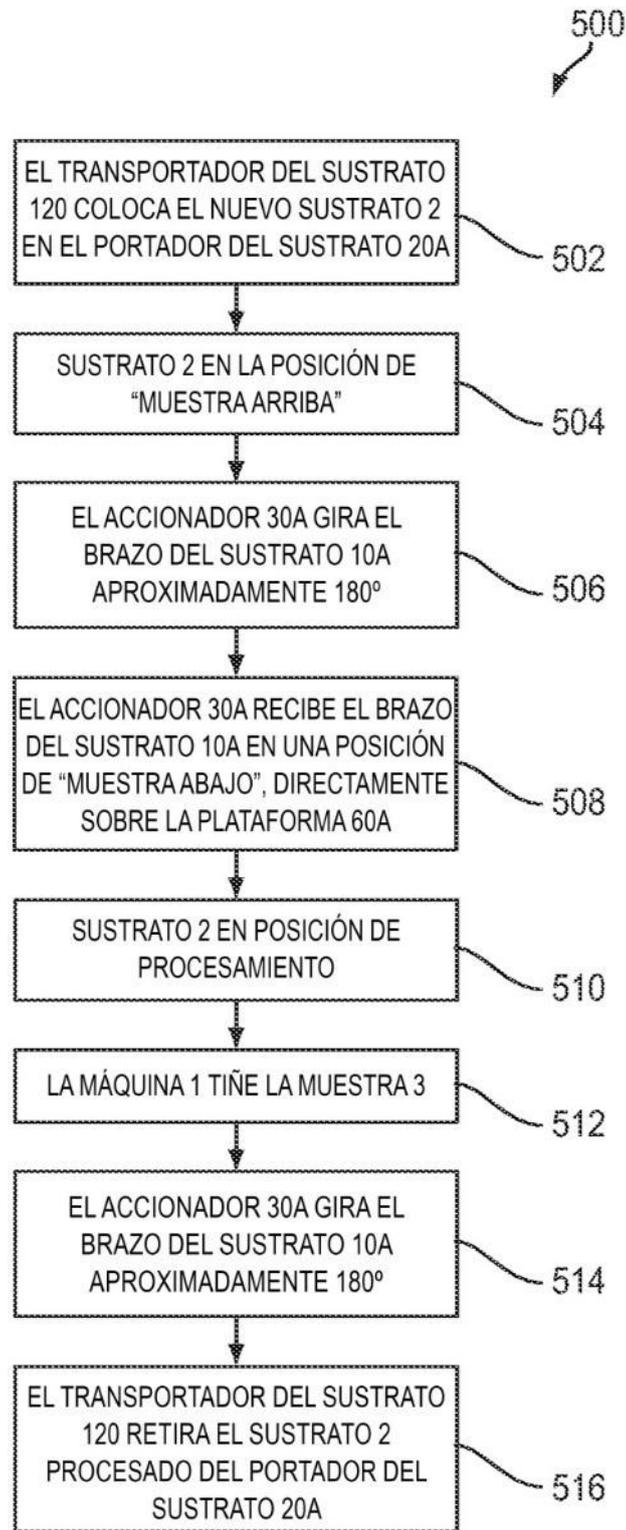


FIG. 7A

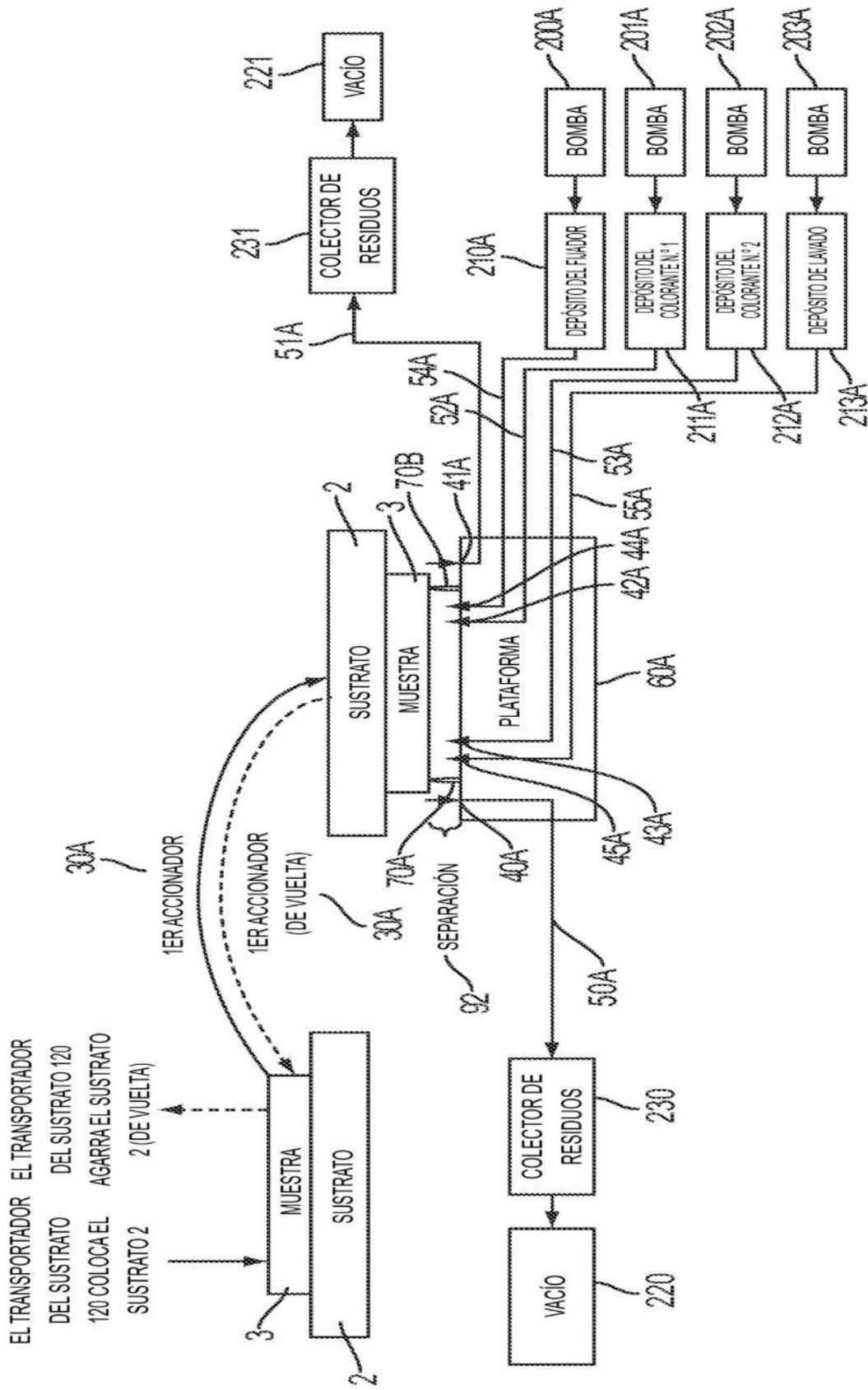


FIG. 7B

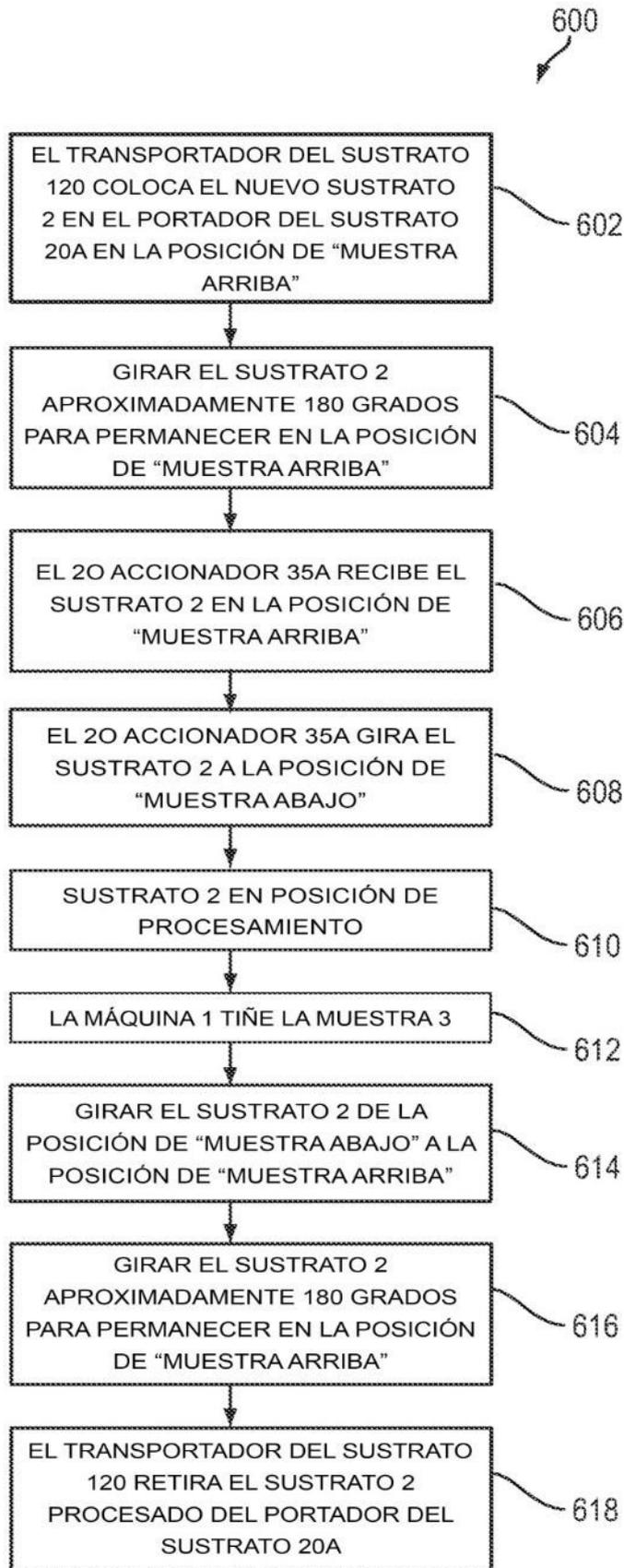


FIG. 8A

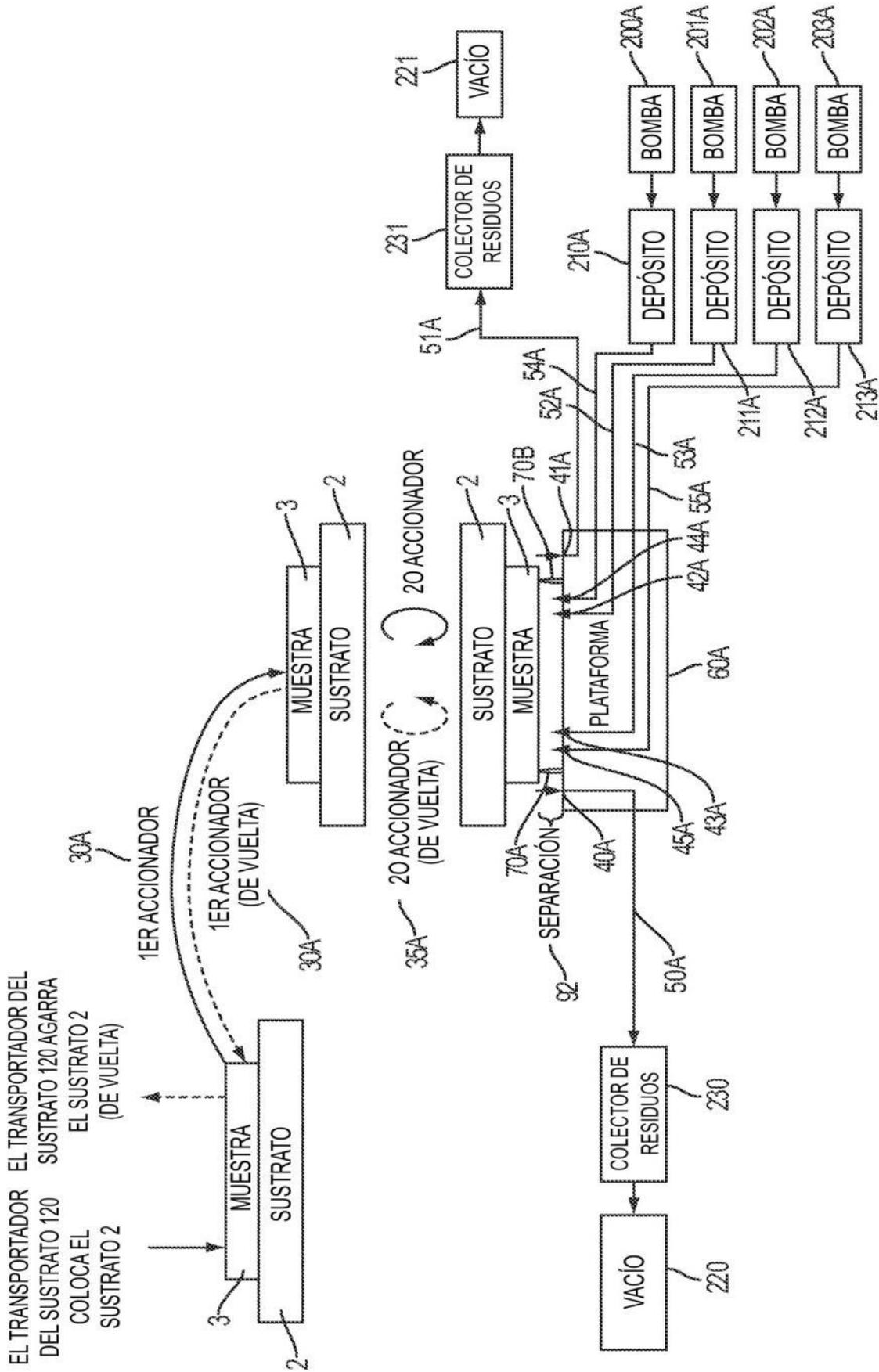


FIG. 8B

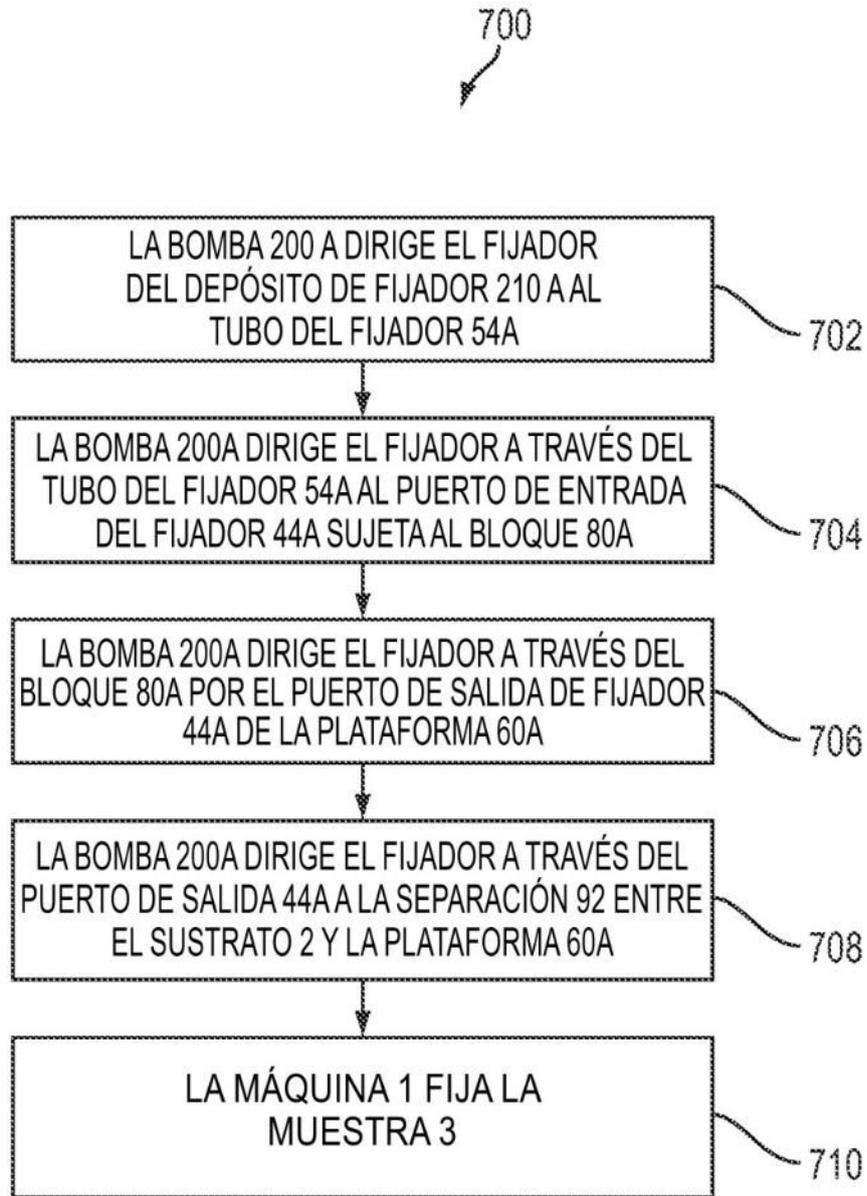


FIG. 9

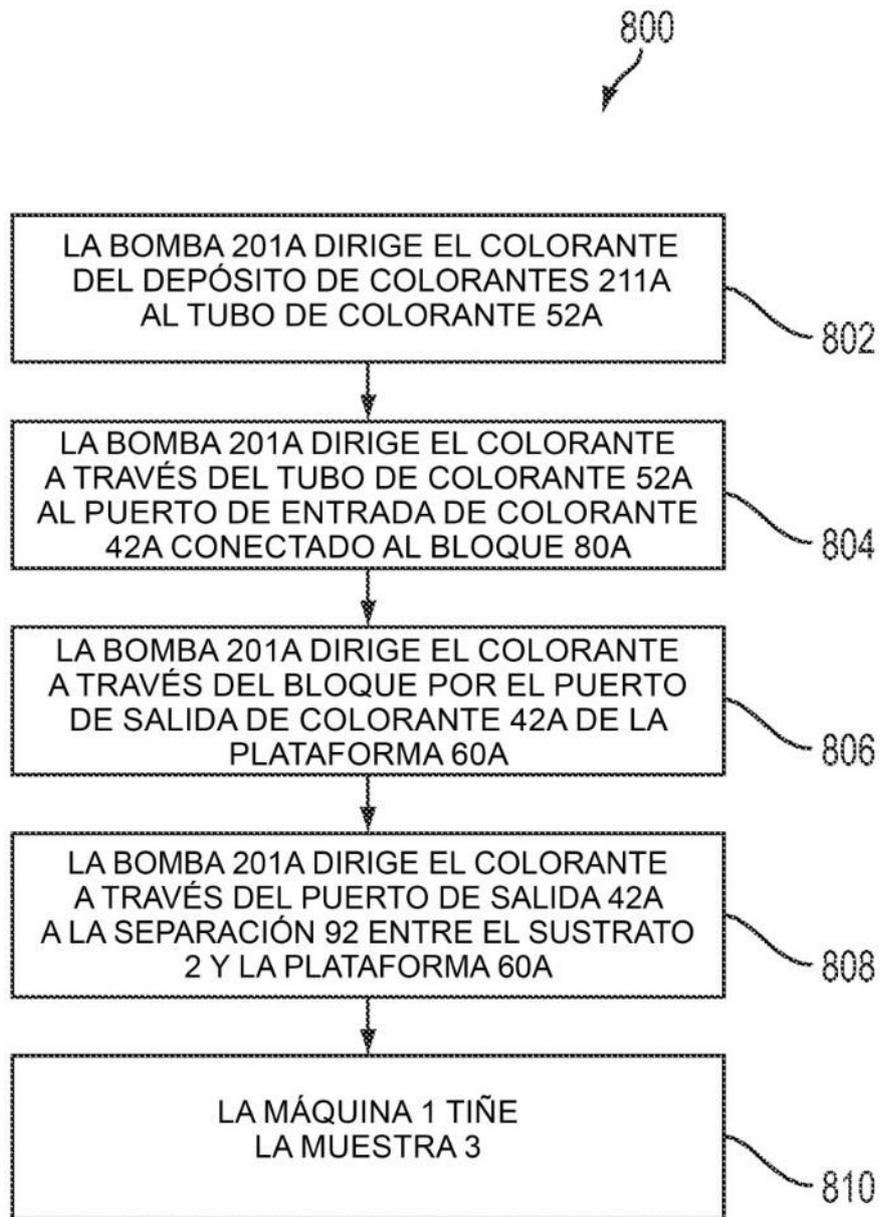


FIG. 10

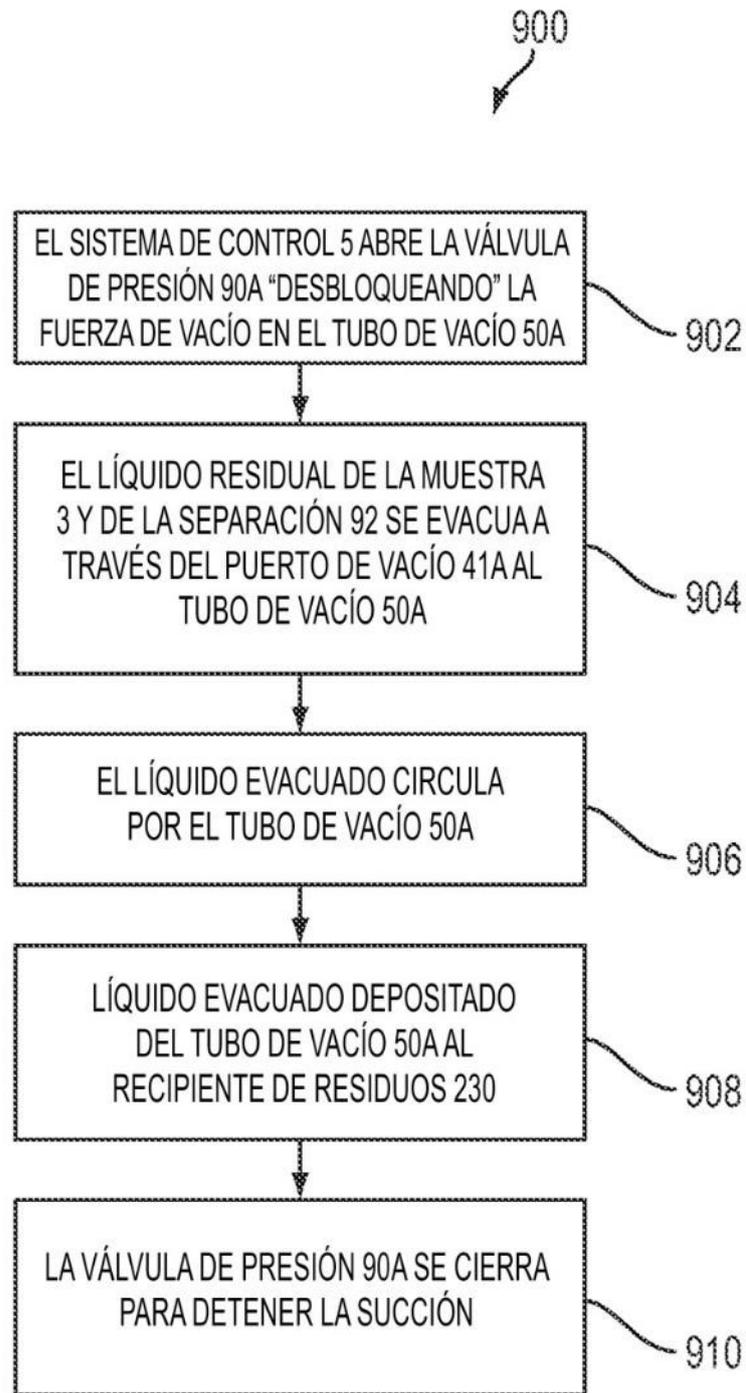


FIG. 11A

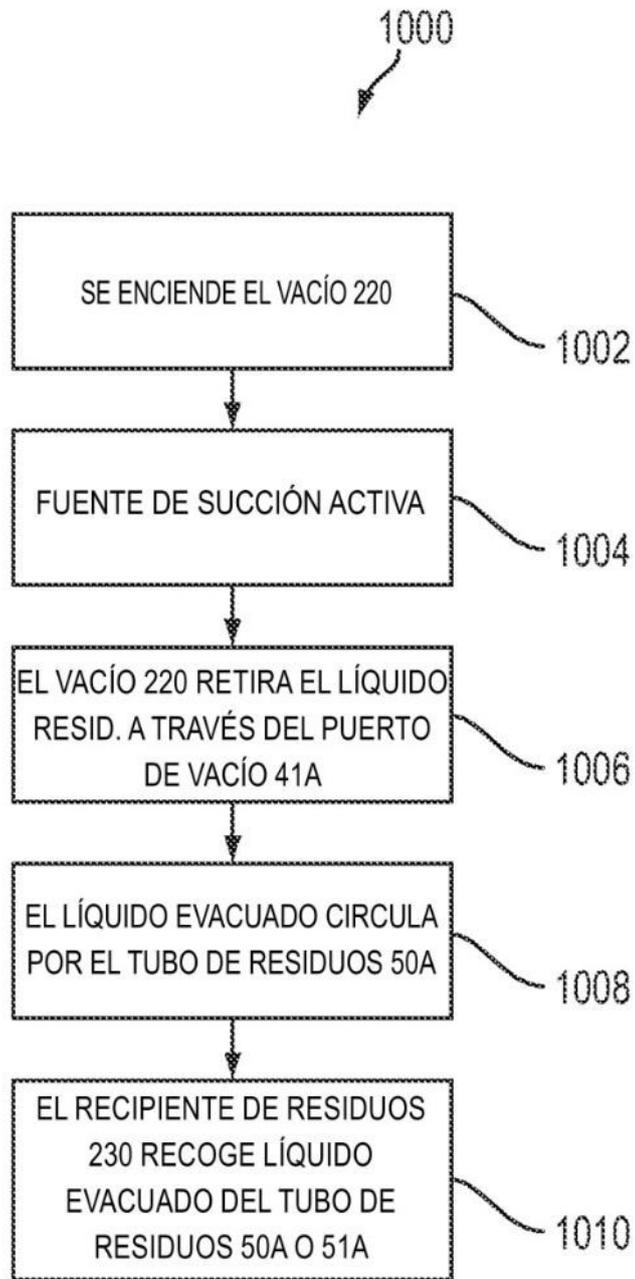


FIG. 11B

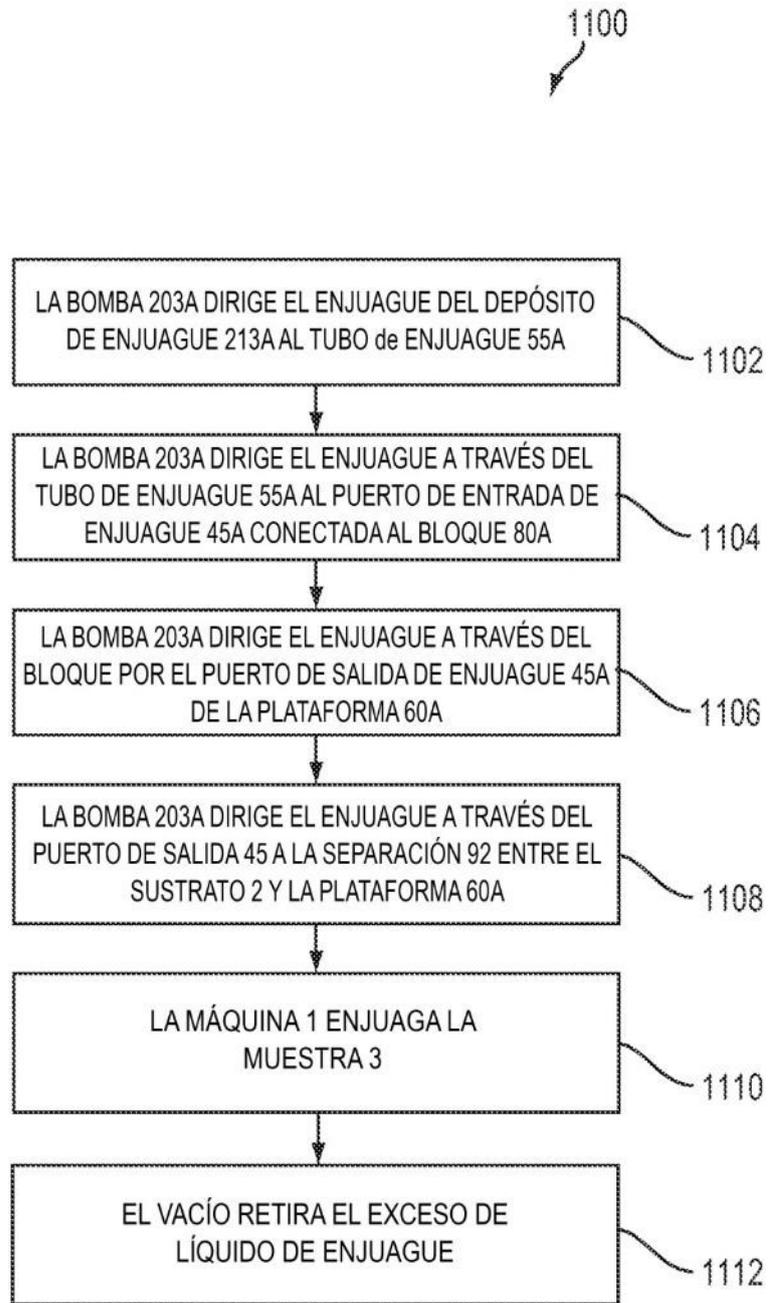


FIG. 12

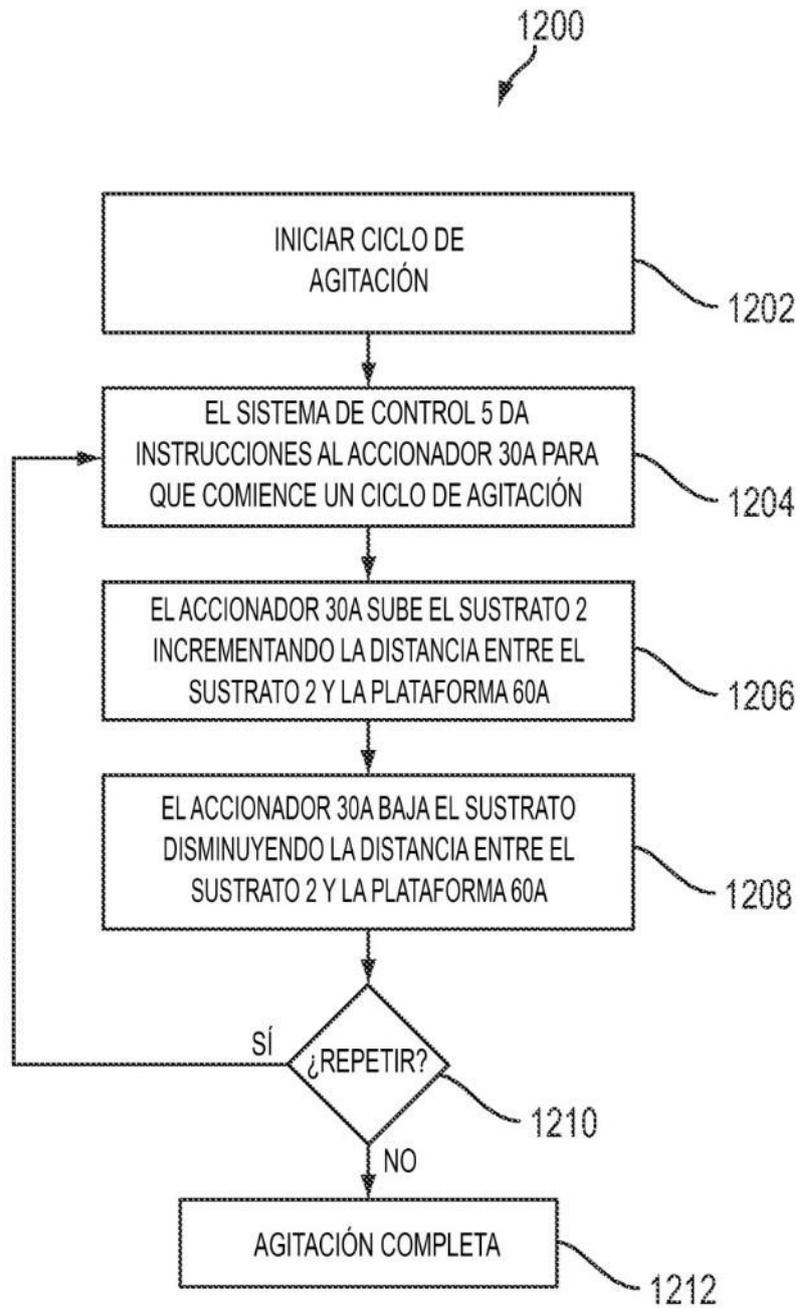


FIG. 13

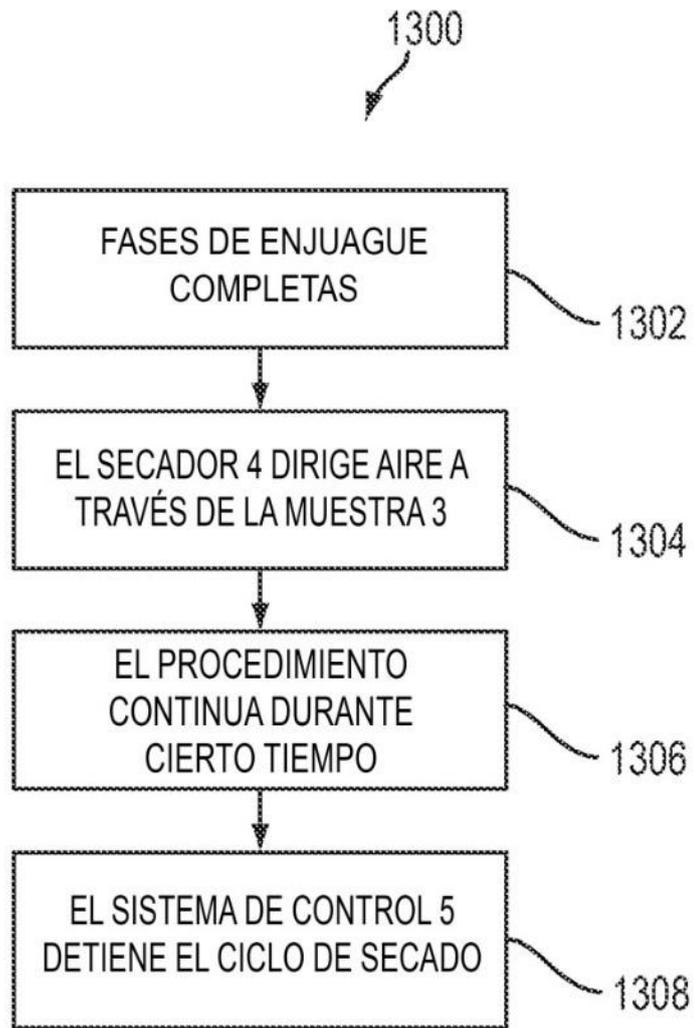


FIG. 14

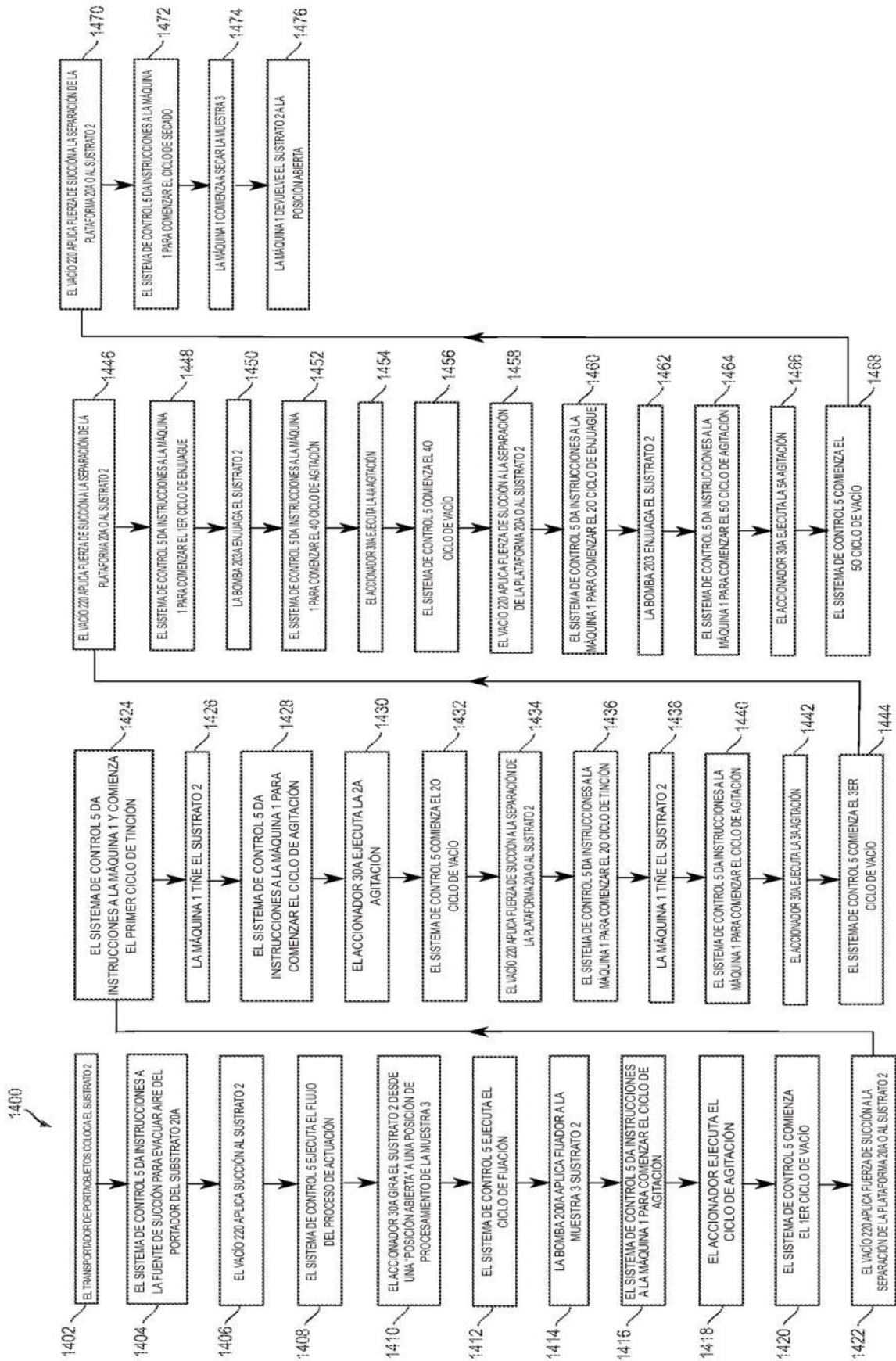
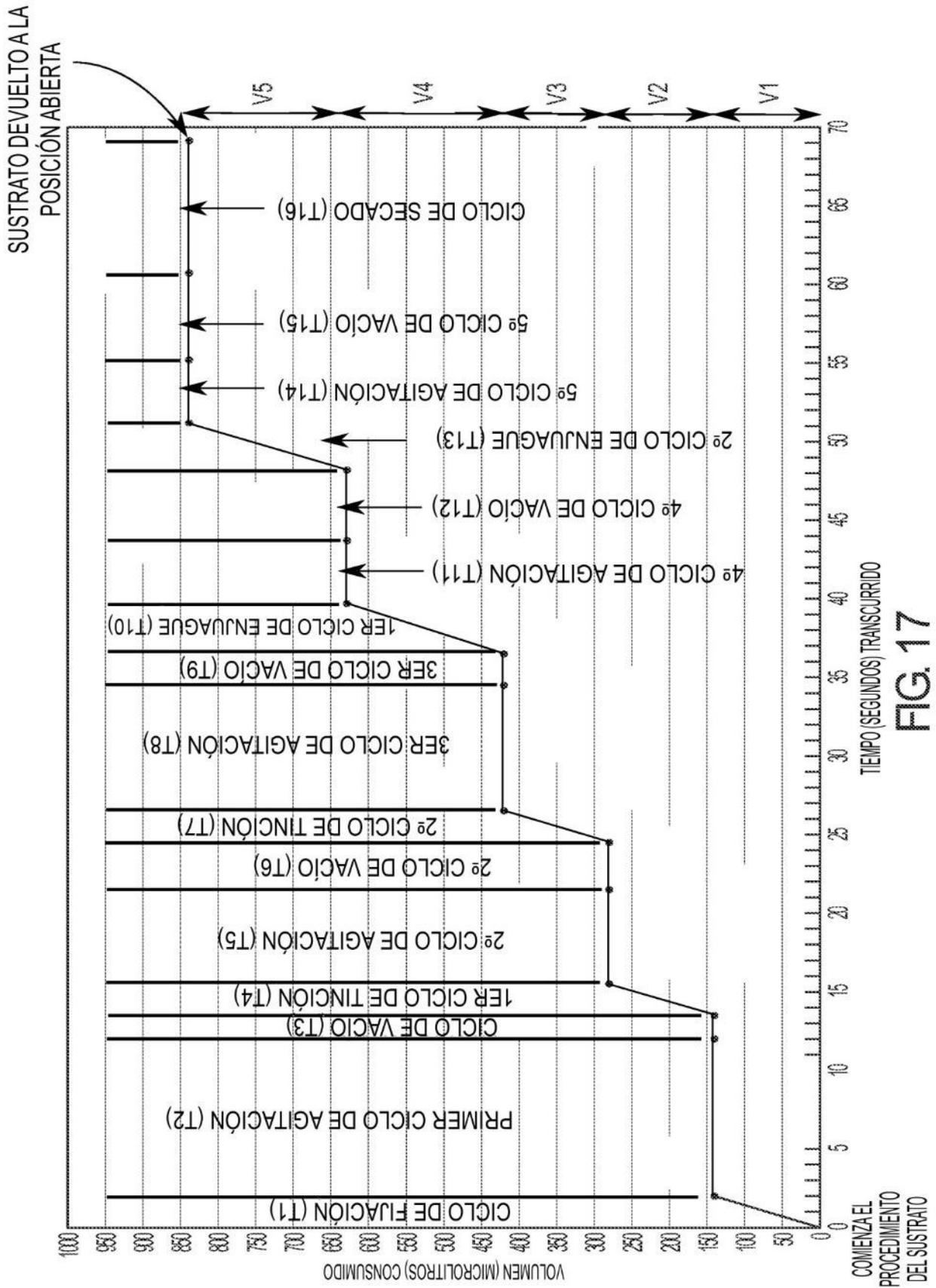


FIG. 16



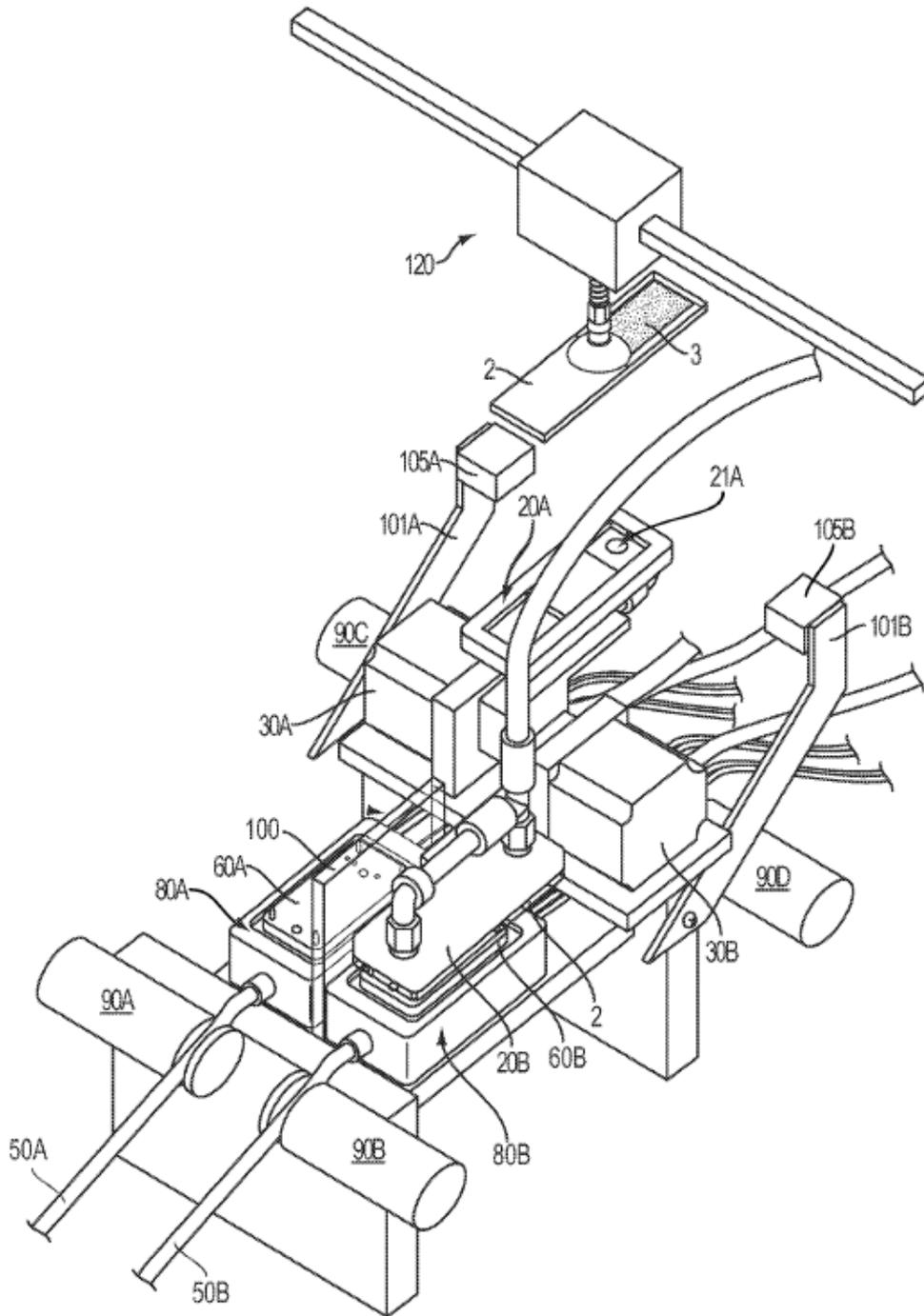


FIG. 18A

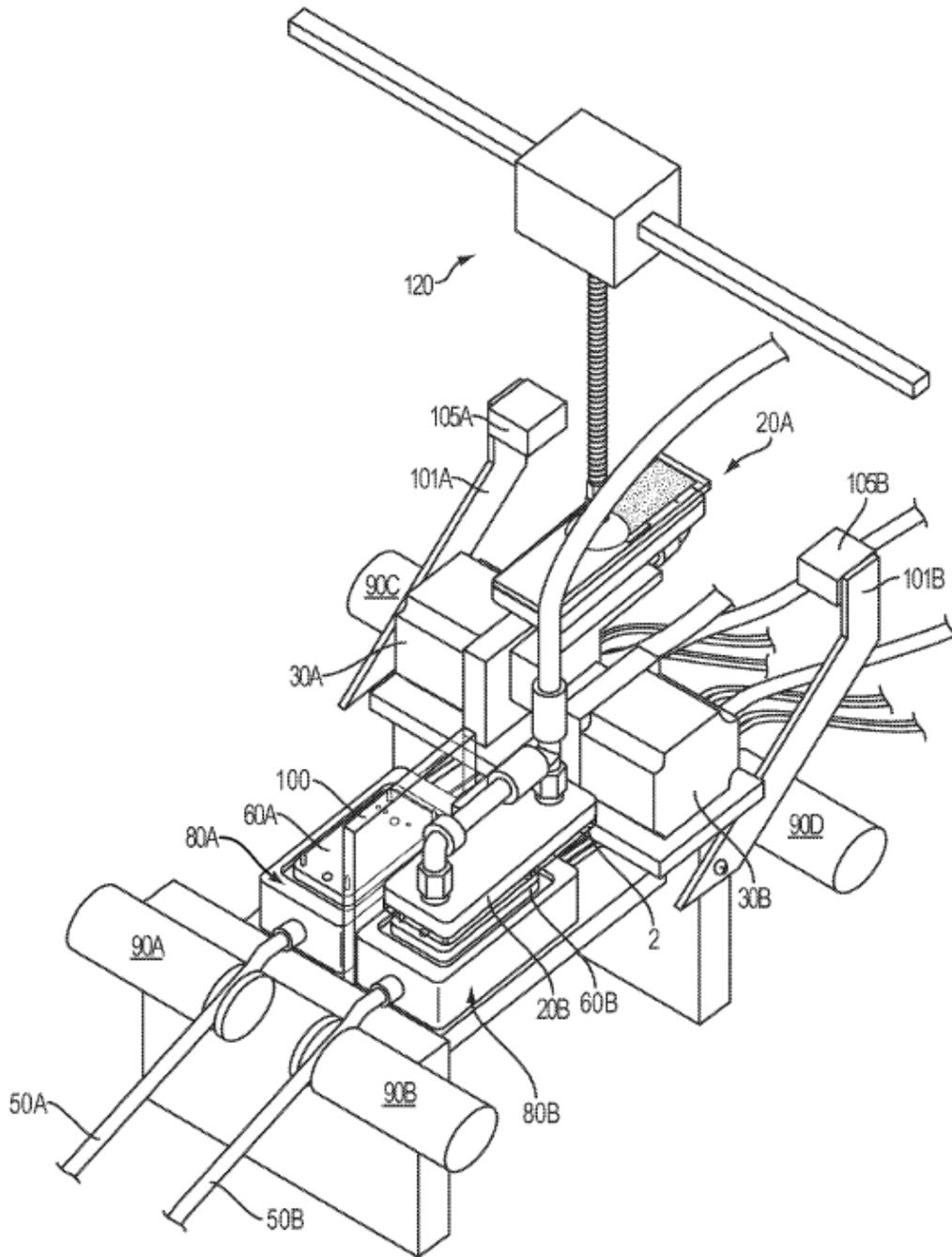


FIG. 18B