



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 373**

51 Int. Cl.:
G01N 1/36 (2006.01)
B01L 3/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02754558 .1**
96 Fecha de presentación : **12.08.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1417472**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2004**

54 Título: **Procedimiento y aparato para preparar y presentar una muestra de tejido para estudio histológico.**

30 Prioridad: **13.08.2001 US 929642**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2011

73 Titular/es: **DAKO DENMARK A/S**
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, DK

72 Inventor/es: **Huang, Dennis, Shihchang y**
Winther, Lars

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 353 373 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

1. Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un método y aparato para la inclusión y presentación de muestras de tejido para examen histológico y, más particularmente, un método para la preparación de una muestra de tejido para examen microscópico.

2. Técnica Anterior

Un procedimiento para preparar muestras de tejido para examen microscópico mediante inclusión del tejido en parafina y cortando el tejido incrustado en parafina en capas finas con un micrótopo para el montaje en un portaobjetos, es bien conocido en la técnica. Antes de la inclusión, el tejido se pretrata en diversas disoluciones seleccionadas de acuerdo con el examen particular que se lleva a cabo. Típicamente, antes de la inclusión en parafina, la muestra de tejido se fija, deshidrata, aclara, infiltra con parafina fundida y, dependiendo del ensayo, se tina.

Para impregnar la muestra de tejido, la muestra se deshidrata, lo más habitualmente con alcohol de isopropilo, y después se sumerge en parafina líquida. La etapa de impregnado en parafina normalmente tiene lugar a presión ambiente y a una temperatura ligeramente superior que el punto de fusión del material de inclusión. En el caso en que el material de inclusión sean parafinas, el punto de fusión está aproximadamente entre 50 grados C y 58 grados C. La sustitución del alcohol de isopropilo contenido en el tejido de las muestras de tejido con parafina se efectúa disolviendo el alcohol de isopropilo en parafina, de manera que la concentración de la parafina aumenta en la muestra de tejido. Cuando la parafina solidifica, pueden cortarse delgadas secciones de las muestras de tejido incrustadas en el bloque de parafina, montarse en un portaobjetos y examinarse bajo un microscopio.

Berger, en la Patente de EE.UU. 5.089.288, describe un método para impregnar una muestra de tejido con parafina en que una muestra de tejido, que se ha fijado con alcohol de isopropilo, se mantiene al vacío en un vaso de tratamiento y la parafina fundida y la muestra de tejido se someten simultáneamente a vibración ultrasónica eficaz para eliminar el alcohol de isopropilo de la muestra de tejido y para impregnar la muestra de tejido con la parafina.

McCormick, en la Patente de EE.UU. 5.665.398, describe un sistema para proporcionar una muestra de tejido incrustado posterior al tratamiento de fluido de la muestra y antes del examen histológico. El sistema incluye la combinación de un módulo para usar en la preparación de muestras de tejido para examen histológico y un molde de inclusión que tiene una primera cavidad para recibir la muestra tratada y una

segunda cavidad para recibir el módulo. El sistema incluye medios para dispensar una cantidad predeterminada de cera fundida en el molde de inclusión.

La Patente de EE.UU. núm. 5.080.869, de McCormick, describe un módulo para el procesado eficaz de muestras de tejido. El módulo es apilable y puede usarse para preparar una pluralidad de muestras. El módulo generalmente incluye una pluralidad de aberturas dispuestas en las paredes del módulo para el paso de fluidos de procesado en una dirección tanto ortogonal como paralela al plano de la pared del fondo del módulo. El módulo incluye además una extensión inclinada de la pared frontal del módulo para facilitar la ubicación de indicios en el módulo para la identificación de la muestra. Ejemplos adicionales de sistemas y métodos útiles para la preparación de muestras de tejido impregnado de parafina para examen histológico, se describen en las Patentes de EE.UU. 5.843.700, de Kerrod, et al., y 4.569.647 de McCormick.

Un problema con los métodos de la técnica anterior de la inclusión y seccionado del tejido es el aglutinado de células de manera que las células de interés pueden no estar presentes en un campo de visión particular. Es deseable, por lo tanto, tener un método para preparar tejido para seccionar de manera que las células que comprenden el tejido estén más o menos uniformemente distribuidas en la sección montada en un portaobjetos, mejorando así la probabilidad de que un tipo de célula particular de interés esté presente en una sección y campo de visión particular.

20 **Resumen**

Es un primer objeto de la invención proporcionar un método para procesar una muestra de tejido para montar en un portaobjetos. Es un objeto adicional de la invención proporcionar un método para preparar un tejido para seccionar en donde las células que comprenden el tejido están esencialmente distribuidas uniformemente a lo largo del preparado de tejido y una sección de tejido derivada del mismo.

Es un objeto total de la invención proporcionar un método para preparar una muestra de tejido para examen en donde la probabilidad de que una célula de interés esté dispuesta en un campo de visión del examinador se mejora cuando se compara con métodos de técnica anteriores de preparado de muestra de tejido.

30 Las características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones añadidas 1 y 4. Sin embargo, la invención en sí misma, tanto como la organización y método de operación, junto con objetos adicionales y ventajas de los mismos puede entenderse mejor por referencia a la siguiente descripción tomada en conjunto con los dibujos que la acompañan en los que:

35

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra la secuencia de etapas usada para la preparación de la muestra de tejido de acuerdo con la presente invención.

5 La Figura 2 es una vista de corte transversal longitudinal de una realización preferida de una pipeta operable para formar una muestra de tejido cilíndrica adecuada para el seccionado.

La Figura 3 y la Figura 4 son diagramas esquemáticos que ilustran las secuencias de etapas de una realización preferida usando un número de taladros.

10 Descripción de las Realizaciones Preferidas

El método para preparar un muestreo de tejido para almacenaje y seccionado se ilustra de forma diagramatical en la Figura 1. Una muestra de tejido 10 se prepara por inclusión en un soporte sólido o semisólido tal como, por ejemplo, agarosa o parafinas, sumergiendo el tejido en un medio fluido adecuado, o una serie de medios fluidos 11, para deshidratar y/o aclarar el tejido. El tejido deshidratado se transfiere entonces en un volumen de parafinas fundidas 12 y el tejido, que puede comprender una línea celular, se fragmenta y se difunde a lo largo del volumen de fusión por medios de dispersión de células 13 tal como un sonicador o agitador mecánico. De forma alternativa, la suspensión de parafina/célula se extruye a lo largo de una sección de tubo mezclador inmóvil caliente, antes de entrar en una sección de tubo frío. El tapón continuo resultante es homogéneo. Los mezcladores inmóviles son tubos o tuberías disponibles comercialmente, que fuerzan al material que fluye a mezclarse mientras pasa diversos obstáculos internos. Los tubos a menudo tienen series de divisores de flujo colocados en diferentes ángulos en el tubo. El tubo puede ser parte de un sonicador continuo permitiendo la homogeneización a gran escala del fundido de parafina/célula caliente y que fluye.

Según una realización de la invención, la introducción es con los mismos o diferentes medios de inclusión fluidos en al menos dos taladros y la extrusión de al menos dos tapones formados para formar un nuevo tapón que contiene al menos dos tapones. Después de que las células que comprenden el tejido se difunden a lo largo del volumen de fundido 14, una pipeta 15 que tiene un taladro axial se emplea para extraer el volumen de fundido en el taladro. El volumen de fundido que contiene el tejido difundido se deja enfriar por debajo de su punto de fusión en el taladro axial. Al endurecerse, el tapón cilíndrico así formado en el taladro axial puede estar totalmente o parcialmente extruido desde la pipeta para el almacenaje y/o seccionado. La pipeta

puede usarse también para almacenar el tejido. El material extruido puede además procesarse adicionalmente como se requiere para otros exámenes del tejido como una microscopia electrónica o espectrometría de fluorescencia.

La pipeta puede colocarse en un puerto receptor 20 en un micrótomo 21 y un disco fino 22 del tapón 14 se extruye del taladro como se muestra en la Figura 2. Una cuchilla del micrótomo 23 se hace avanzar para separar el disco extruido del tapón. El disco 22 se transfiere entonces a un soporte tal como un portaobjetos del microscopio 24 para el tinto y el examen. El diámetro del taladro axial, y por tanto, el diámetro del tapón y el disco, puede ser "tipo alfiler", que tiene un diámetro de -0,1 mm, o "tipo oblea", con un diámetro de -1,5 cm, o incluso mayor. La pipeta puede ser cualquiera preferiblemente un miembro tubular rígido. Los materiales preferidos son cristal y elastómeros rígidos o semi-rígidos tales como polietileno, polipropileno o poliestireno. Los medios para extraer el fundido en el taladro axial del tubo incluyen aspiración al vacío, centrifugado y acción capilar. Un medio preferido de aspiración al vacío es un émbolo 25 dispuesto de forma deslizable dentro del taladro axial del miembro tubular. Mientras las parafinas tradicionales pueden usarse de acuerdo con el presente método, un medio de inclusión preferido es un gel hidrófilo tal como agarosa.

En una variación del método para preparar una parte de un tejido que comprende células para examen microscópico presentado anteriormente, el miembro tubular comprende un material polimérico que permanece rígido a la temperatura de fusión del medio de inclusión y es fácilmente separable de si mismo como, por ejemplo, cortándose por una hoja de cuchillo. El tapón cilíndrico de tejido incrustado en el taladro axial del miembro tubular polimérico no necesita extruirse del taladro antes del montaje. De acuerdo con el método alternativo, una parte de tejido se coloca en un volumen de un medio de inclusión fluido, después las células que comprenden el tejido se desorganizan hasta que las células que comprenden la parte se distribuyen esencialmente de forma homogénea a lo largo del volumen de medio de inclusión fluido fundido. Una parte del volumen del medio de inclusión fluido se extrae en el taladro axial del miembro tubular polimérico y se permite solidificar en el taladro axial para formar un tapón cilíndrico. Después de formarse el tapón cilíndrico, una parte del miembro tubular (que contiene una parte del tapón cilíndrico) se corta entonces de forma transversal o se separa de otra forma del resto del miembro tubular para formar una parte separada. La parte separada, que incluye un disco delgado de células incrustadas unidas de forma circunferencial y contenidas en un anillo que comprende una parte del miembro tubular polimérico, se monta entonces en un sustrato de soporte rígido.

Es ventajoso hacer preparados que contengan tejidos o células múltiples y diferentes.

En otro aspecto de la invención, un bloque de metal caliente o frío (31) con un número de taladros (32) conectados a tapones móviles (33) en un extremo, pueden
5 rellenarse cada uno con los mismos o diferentes tejidos o células en un líquido adecuado (34). Aplicando ondas sónicas u otros movimientos mecánicos (35) al bloque entero, las células se dispersan homogéneamente en cada taladro.

El bloque de metal se deja enfriar y los líquidos solidifican en cada taladro. Aplicando presión o apretando (41), los tapones ascienden o descienden parcialmente en
10 un envase adicional (42) unido al bloque de metal, los tapones (43) quedarán libres y en paralelo en el envase.

El envase se llena con parafina, preferible con un punto de fusión menor, y se deja solidificar por enfriamiento (44) cubriendo los tapones.

La parafina o gel resultante se corta (45) o secciona para dar una torta delgada
15 de parafina o gel que contiene láminas (46) de cada uno de los tapones. La delgada rodaja se monta en portaobjetos (47) y se procesa adicionalmente como se necesita para el examen de tejidos en microscopios.

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, el tamaño de las secciones puede controlarse y las células que comprenden el tejido están esencialmente distribuidas de forma homogénea en el tapón y, por lo tanto, una sección se
20 separa de allí.

Cualquier material de inclusión fluido que pueda solidificarse después de haberse transferido al taladro axila del tubo tal como por reposo, adición de un catalizador al fluido o radiación UV, puede usarse de acuerdo con el presente método. Se
25 pretende por lo tanto, cubrir en las reivindicaciones añadidas, todos los cambios y modificaciones que están en el alcance de esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una parte de un tejido que comprende células para examen microscópico que comprende las etapas de:

- 5
- (a) colocar la parte de tejido en un volumen de un medio de inclusión fluido, después
- (b) desorganizar dicha parte hasta que dichas células comprendidas en dicha parte se distribuyen esencialmente de forma homogénea a lo largo de dicho volumen de dicho medio de inclusión fluido; después
- 10
- (c) introducir una parte de dicho volumen de dicho medio de inclusión fluido en un taladro axial en un miembro; después
- (d) solidificar dicha parte de medio de inclusión fluido en dicho taladro axial para formar un tapón cilíndrico; después
- (e) extruir una parte de dicho tapón cilíndrico de dicho taladro axial y separar una parte de dicho tapón cilíndrico para formar una parte
- 15
- separada; después
- (f) montar dicha parte separada de dicho tapón cilíndrico en un sustrato de soporte rígido.

2. El método según la reivindicación 1, en donde dicho tejido es una línea celular.

20

3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde la introducción es con los mismos o diferentes medios de inclusión fluidos en al menos dos taladros; y la extrusión de dichos, al menos dos, tapones formados para formar un nuevo tapón que contiene dichos, al menos dos, tapones.

25

4. Un método para preparar una parte de un tejido que comprende células para examen microscópico, que comprende las etapas de:

- (a) colocar la parte de tejido en un volumen de un medio de inclusión fluido, después
- (b) desorganizar dicha parte hasta que dichas células comprendidas en dicha parte se distribuyen esencialmente de forma homogénea a lo
- 30
- largo de dicho volumen de dicho medio de inclusión fluido; después
- (c) introducir una parte de dicho volumen de dicho medio de inclusión fluido en un taladro axial en un miembro; después
- (d) solidificar dicha parte de medio de inclusión fluido en dicho taladro axial para formar un tapón cilíndrico; después

- (e) separar una parte de dicho miembro que contiene una parte de dicho tapón cilíndrico de dicho miembro para formar una parte separada; después
- (f) montar dicha parte separada de dicho miembro y el tapón cilíndrico en un sustrato de soporte rígido.

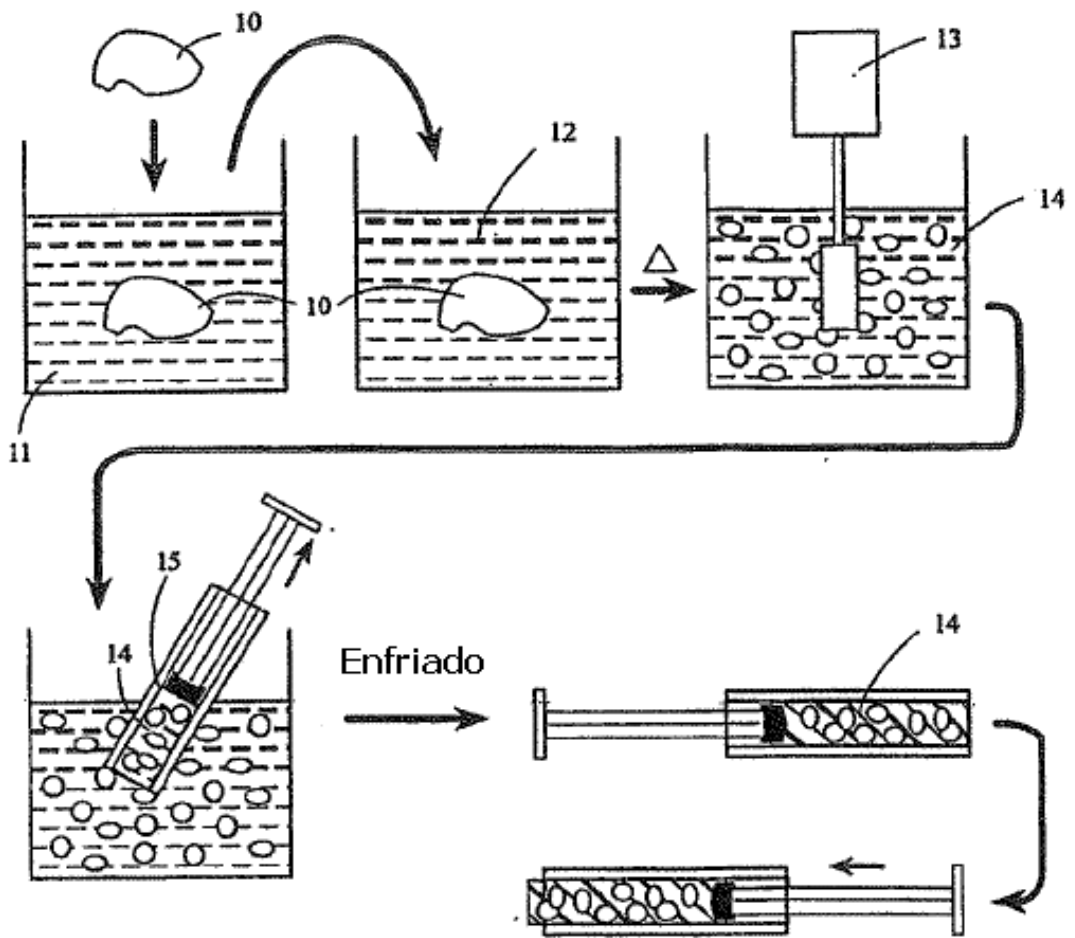


Figura 1

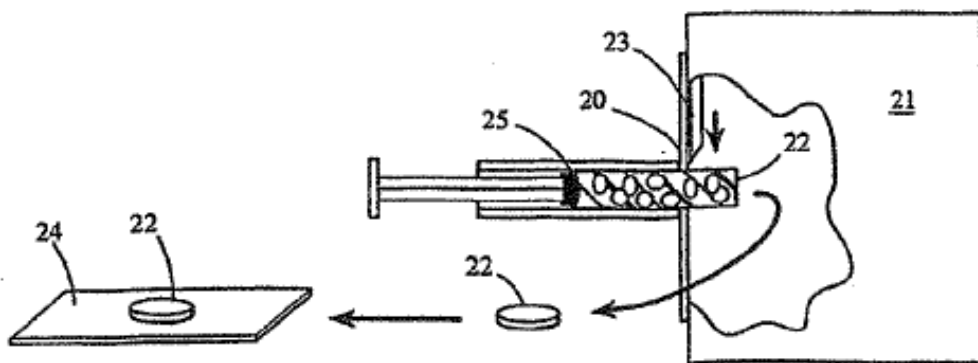


Figura 2

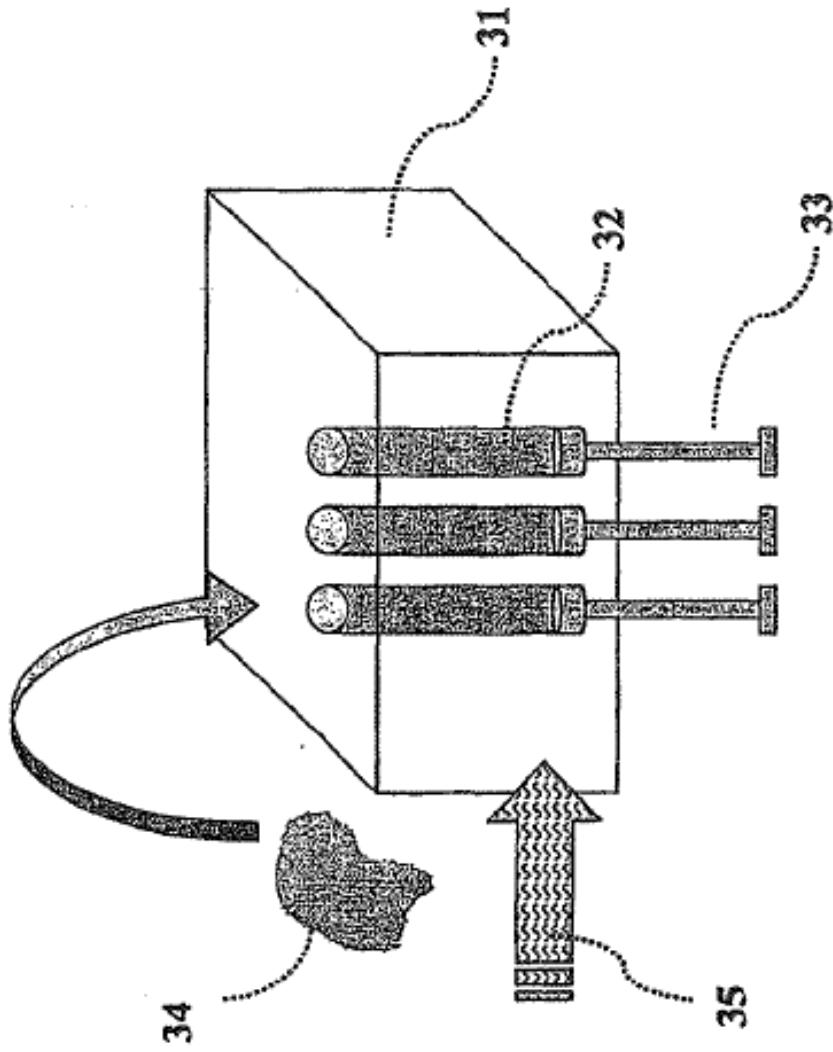


Figura 3

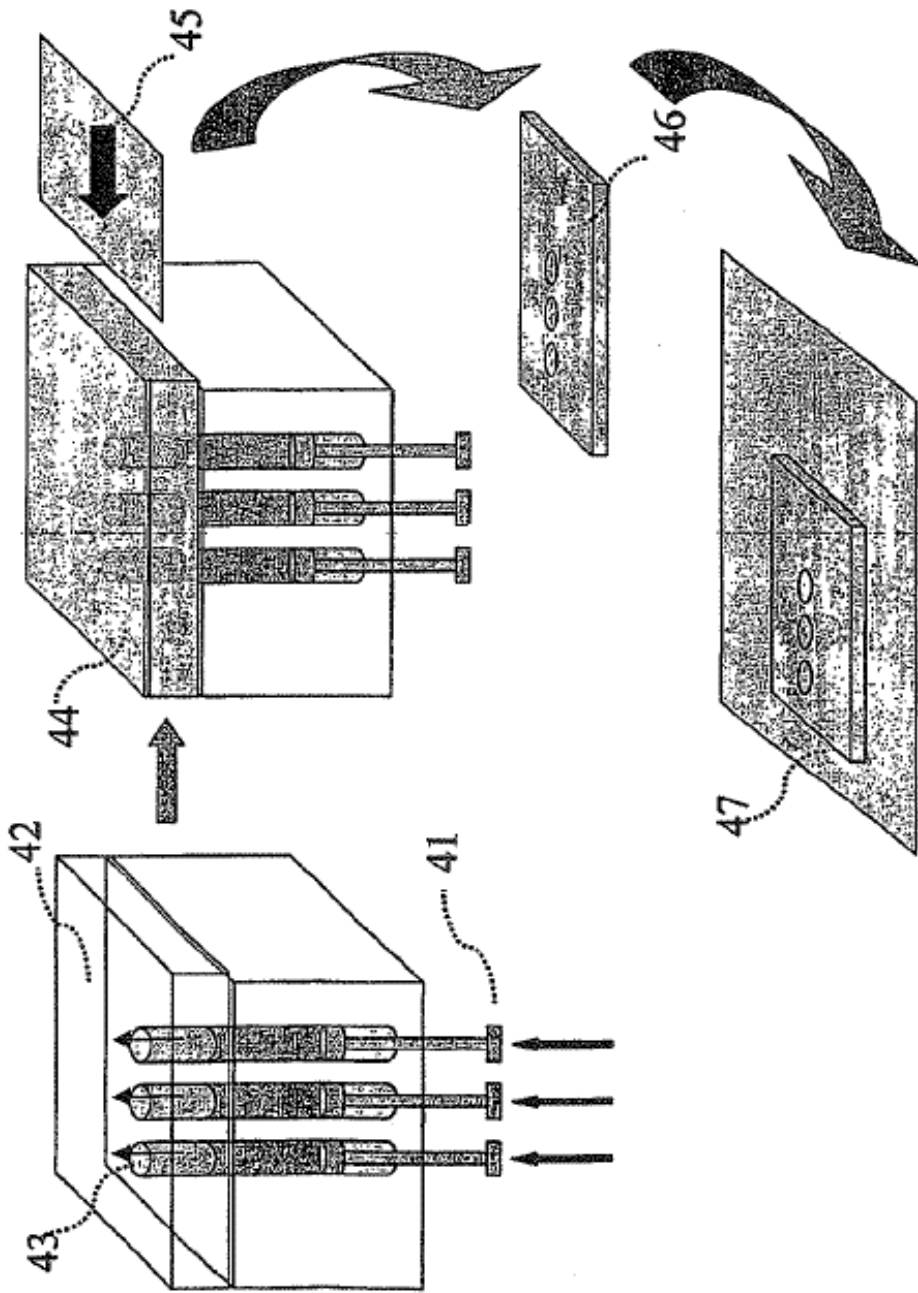


Figura 4