



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 362**

51 Int. Cl.:
G01N 1/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00922201 .9**

96 Fecha de presentación : **14.04.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1171761**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2002**

54 Título: **Intercambio de fluidos en una cámara sobre un portaobjetos de microscopio.**

30 Prioridad: **20.04.1999 US 130171 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **Dako Denmark A/S**
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, DK

72 Inventor/es: **Loeffler, Herbert, H. y**
Bogen, Steven, A.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 316 362 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

Intercambio de fluidos en una cámara sobre un portaobjetos de microscopio.

5 **Fundamento de la invención**

Esta invención se refiere a un instrumento que es capaz de realizar incubaciones de pequeños volúmenes de reactivos sobre la superficie de un portaobjetos de microscopio. Una diversidad de ensayos se llevan a cabo, típicamente, sobre la superficie de un portaobjetos de microscopio. Estos ensayos pretenden, por lo general, determinar si un pre-
10 sunto analito se encuentra presente en la biopsia de un paciente. Estos ensayos incluyen: (1) hibridación *in situ*, para detectar dianas de ácidos nucleicos en un tejido o en una muestra de células, (2) inmunohistoquímica, para detectar proteínas específicas en un tejido o en una muestra de células, (3) tinciones histoquímicas, para detectar ciertos tipos de compuestos químicos o ciertas clases de microorganismos en una muestra de un tejido. Además, hay otros dos tipos de ensayos que se llevan a cabo frecuentemente sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio. En vez de ensayar la
15 presencia de un analito en la biopsia de un tejido, estos ensayos pretenden detectar moléculas específicas existentes en una solución. Estos ensayos son (1) conjuntos de genes, en los que un conjunto de dianas de ácidos nucleicos conocidas son inmovilizadas directamente sobre el portaobjetos de vidrio, y (2) conjuntos de proteínas, en los que un conjunto de proteínas conocidas son inmovilizadas sobre el portaobjetos de vidrio.

En todos estos casos, un portaobjetos de vidrio sirve como el soporte preferido sobre el que se lleva a cabo el ensayo. La razón de usar un portaobjetos de vidrio es que es transparente desde el punto de vista óptico y plano. Estas propiedades físicas facilitan la aptitud de un instrumento, tal como un microscopio, para detectar ópticamente una señal fluorescente o colorimétrica. Con objeto de destacar ciertas características deseadas, los ensayos anteriores requieren que los portaobjetos sean tratados con una serie de incubaciones de reactivos. Cada incubación necesita
20 tener lugar durante un período de tiempo específico (típicamente 15-60 minutos) y a una temperatura especificada (típicamente, desde temperatura ambiente hasta 95°C).

Las ventajas ópticas de un portaobjetos de microscopio están algo contrapesadas por ciertas dificultades existentes en la realización del ensayo. El tratamiento de los cortes de un tejido sobre un portaobjetos de microscopio con la finalidad de destacar determinadas características histológicas se denomina frecuentemente “tinción”. Dado que la su-
30 perficie del portaobjetos es plana el reactivo puede escaparse fácilmente por el borde del portaobjetos de microscopio, en especial si el portaobjetos no está perfectamente nivelado. Además, la gran relación de la superficie respecto del volumen del reactivo extendido sobre la superficie del portaobjetos, favorece la evaporación. La evaporación del reactivo interfiere con la realización del ensayo. Si el reactivo se evapora, entonces no estará continuamente en contacto con la muestra de tejido. Los aparatos de desecación pueden hacer que el resultado del ensayo (“mancha”) no sea el correcto. Finalmente, es importante esparcir el reactivo sobre la superficie del portaobjetos. A veces se usan tensioactivos para favorecer la diseminación del reactivo. Si el reactivo no se esparce, la reacción puede fallar en tener lugar sobre la
35 totalidad de la biopsia del tejido, o sobre todas las partes del conjunto. Por consiguiente, la técnica anterior comprende un gran número de intentos para construir aparatos y dispositivos que pretenden facilitar o automatizar las etapas de preparación o tratamiento de una muestra biológica sobre un portaobjetos de vidrio.

El enfoque general para la resolución de estos problemas en tiempos pasados ha consistido en cerrar una zona de la superficie del portaobjetos formando una cámara. Las características deseables de una cámara tal son:

- 45 a) Diseminación de los líquidos. Los reactivos deben esparcirse uniformemente sin captar burbujas de aire.
- b) Uso de un volumen mínimo de reactivos (idealmente menos de 100 microlitros para cubrir la superficie del portaobjetos).
- 50 c) Evitar la evaporación cuando el reactivo se calienta a 95°C.
- d) Inyección y retirada automática de los reactivos. Es decir, es necesario que el aparato sea compatible con un sistema automatizado de transferencia de fluidos.
- 55 e) Protección del corte de tejido contra daños físicos.

Un método de cumplimiento de al menos algunos de los requisitos descritos, consiste en retener el reactivo bajo un cubreobjetos. Para los procedimientos operatorios convencionales de hibridación *in situ*, el reactivo se coloca directamente, con una pipeta, sobre la parte superior del corte de tejido y se tapa con un cubreobjetos. Después, los
60 bordes del cubreobjetos se cierran herméticamente con pulimento de uñas o con adhesivo de goma. El cubreobjetos esparce el reactivo en forma de una capa relativamente uniforme y al tiempo evita su evaporación. Es importante evitar que queden captadas burbujas de aire bajo el cubre objetos. De otro modo, puede existir una zona del corte de tejido que no se pone en contacto con la solución de hibridación.

No existe tecnología adecuada para automatizar la colocación de cubreobjetos para realizar hibridaciones *in situ*. Pueden aplicarse cubreobjetos a portaobjetos de un modo automatizado; diversas compañías que se mueven en el campo de la histopatología venden máquinas dedicadas a la colocación de cubreobjetos. No obstante, tales máquinas de colocación de cubreobjetos no son adaptable, probablemente, a esta solicitud de patente, debido a que (i) es

difícil automatizar la hermetización de los bordes de los cubreobjetos, por ejemplo con goma, y (ii) es difícil retirar robóticamente los cubreobjetos sin dañar el corte de tejido.

Un método alternativo para esparcir cantidades pequeñas de reactivos, ha sido descrito en 1988 por Unger *et al.*, (Unger, ER, DJ Brigati, ML Chenggis, *et al.*, 1988. Automation of *in situ* hybridization: Application of the capillary action robotic workstation. *J. Histotechnology* 11:253-258). Específicamente, estos autores han descrito una modificación del dispositivo de tinción de portaobjetos Code-On para usar con hibridaciones *in situ*. En lugar de un cubreobjetos, se colocaron dos portaobjetos en yuxtaposición estrecha formando un espacio intermedio capilar. Los líquidos, tales como las soluciones de hibridación, podrían aplicarse entonces a la parte inferior de este espacio. Los reactivos “ascienden” por acción capilar. Colocando los portaobjetos en una cámara caliente, con humedad, se evita la evaporación. El dispositivo Code-On ha trabajado bien en las manos correctas, pero era trabajoso de usar y requería cada día una gran dosis de experiencia y de cuidados días para su establecimiento. Pequeños arañazos o ligeras imperfecciones de la superficie del portaobjetos de vidrio, causaban, frecuentemente, el que quedaran atrapadas burbujas de aire en el espacio intermedio capilar, dando por resultado zonas de tejido sin teñir.

Una descripción primitiva de una cámara de portaobjetos está descrita en las patentes de EE.UU. Nos. 4.847.208 y 5.073.504. Una cámara estaba yuxtapuesta a la superficie de un portaobjetos formando paredes capaces de evitar el derramamiento lateral de los reactivos. Además, una cubierta articulada reducía al mínimo la pérdida por evaporación de los reactivos. Cada cámara incluía una puerta de entrada y salida de fluidos.

El documento WO99/34190 describe una cámara formada por la inserción de un portaobjetos de microscopio en un dispositivo de cartucho. El reactivo se distribuye sobre una parte del portaobjetos que sobresale desde el cartucho y se hace que fluya en un espacio intermedio de tipo capilar moviendo la portaobjetos hacia dentro. La cámara no es hermética con respecto al medio ambiente exterior. Por consiguiente, es de esperar que el reactivo se evapore, en especial si las muestras se calientan. Además, el reactivo puede circular alrededor y por debajo del portaobjetos, aumentando por ello el requisito de volumen necesario para cubrir la superficie del portaobjetos. Finalmente, no está claro con que frecuencia pueden ser captadas burbujas sobre la superficie del portaobjetos, dado que ningún mecanismo específico existente en el cartucho lo evita.

Una revisión de otros métodos de formación de una cámara y sus inconvenientes, figuran descritos también en la sección de Fundamento del documento WO99/34190.

El documento US 4.604.964 describe un aparato de tratamiento de tejidos que comprende una cámara de tratamiento, una pluralidad de recipientes de reactivo y una válvula selectora para conectar secuencialmente la cámara de tratamiento con cada uno de dichos recipientes de reactivo, para hacer pasar fluido entre la cámara y tales recipientes.

El documento US 4.433.270 enseña un aparato para pre-tratar y parafinar automáticamente muestras biológicas en un recipiente único, para la preparación bloques de muestras para ser cortadas con un microtomo en piezas delgadas para estudiar al microscopio. Un montaje de una válvula selectora giratoria con una válvula de compuerta incorporada, colocaba una pluralidad de recipientes de reactivo, que contenían diversos reactivos con inclusión de parafina fundida, en comunicación y fuera de comunicación con el recipiente de tratamiento en una secuencia previamente establecida.

El documento WO98/20353 describe una muestra de tejido colocada sobre un soporte compuesto, de intercelulosa y nilón poroso, y liofilizado, para producir microcanales verticales a través de la muestra. Reactivos líquidos inmunocitológicos son perfundidos luego a través de la muestra porosa y el soporte, proporcionando un contacto íntimo entre la muestra y los reactivos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un aparato para añadir y retirar reactivos líquidos a y desde una muestra mantenida sobre una superficie plana, una cámara que forma una cavidad sobre dicha superficie plana, estando dicha cámara hermetizada de modo separable a dicha superficie plana; una puerta de fluidos en la pared de dicha cámara a través de la cual pueden añadirse o retirarse fluidos; y un conducto a través del cual puede comunicarse un origen de presión de aire, negativa o positiva; caracterizado por: un impulsor capaz de mover la puerta de fluidos y el conducto respecto uno de otro para ajustar dicho conducto y dicha puerta de fluidos, uno con otro, de modo que los dos estén en comunicación mutua de fluidos.

La presente invención proporciona, además, un método para añadir y retirar un reactivo líquido a y desde una muestra mantenida sobre una superficie plana separada desde otra superficie por: hermetización de modo separable de una cámara a dicha superficie plana para formar una cavidad sobre dicha superficie plana; conduciendo fluido hacia la cavidad a través de la puerta de fluidos con un origen de presión, negativa o positiva, comunicada a través del conducto, que se caracteriza por: un impulsor que mueve un conducto en relación con una puerta de fluidos, para ajustar mutuamente el conducto y la puerta de fluidos, de modo que ambos estén en comunicación mutua de fluidos.

En realizaciones de la presente invención, el aparato de manipulación de fluidos es capaz de esparcir pequeñas cantidades de un reactivo líquido sobre una superficie plana, tal como un portaobjetos de microscopio, de vidrio. El reactivo puede encerrarse herméticamente dentro de una cavidad confinada, o “cámara”, evitándose de este modo la evaporación incluso con calentamiento, de pequeñas cantidades de reactivo durante un período de incubación. Una

ES 2 316 362 T3

superficie de esta cámara es la superficie plana del portaobjetos. Las superficies restantes están formadas por una celdilla. La celdilla es, preferiblemente, una parte de plástico desechable que se acopla sobre la parte superior del portaobjetos, sobre la zona que contiene el tejido, células biológicas o conjunto mantenido sobre el portaobjetos de vidrio. La celdilla forma un cierre hermético a los fluidos con la superficie del vidrio por medio de una junta de estanqueidad. La junta está montada en una depresión situada sobre la cara de la celdilla que casa con el portaobjetos de vidrio.

Cada celdilla posee dos puertas de fluidos. Estas puertas están en comunicación de fluidos con la cámara. Por consiguiente, cuando se inserta en una puerta de fluidos un reactivo líquido, éste puede viajar hacia la cámara y ponerse en contacto con la muestra biológica o el conjunto biológico mantenido sobre la superficie de vidrio. Las puertas de fluidos sobre una celdilla están colocadas, preferiblemente, sobre extremos opuestos de la celdilla. Esto permite que un reactivo líquido o una solución de lavado circulen por una puerta de fluidos, llene la cámara y después salga por la otra puerta de fluidos situada en el otro extremo de la celdilla. Cada una de las puertas de fluidos posee una válvula que cierra el orificio que, normalmente, está cerrado. Por consiguiente, la cámara está hermetizada. A menos que las válvulas se abran, la cámara no está accesible, normalmente, al medio ambiente externo. Los reactivos líquidos o las soluciones de lavado solamente se añaden o se retiran abriendo una o ambas válvulas asociadas con las puertas de fluidos. El hecho de que las puertas de fluidos estén normalmente herméticamente cerradas por válvulas, ayuda a evitar la evaporación.

El instrumento comprende una pluralidad de posiciones para portaobjetos de vidrio. Cada posición posee un mecanismo para afianzar una celdilla al portaobjetos de vidrio. El mantenimiento de la celdilla y el portaobjetos yuxtapuestos en una relación espacial fija, es importante para formar una cámara herméticamente cerrada para realizar incubaciones de reactivos. Los reactivos y las soluciones de lavado se añaden y se retiran mediante el uso de dos “estaciones” de manipulación de líquidos. En la realización ilustrada, las estaciones de manipulación de líquidos se mueven sobre portaobjetos que no se mueven. También es concebible, y últimamente preferido de un instrumento automatizado, invertir tal relación para automatizar el proceso de tinción mediante el movimiento de los portaobjetos, por ejemplo, mediante un carrusel giratorio. Los portaobjetos podrían moverse pasadas las estaciones de manipulación de líquido que no se mueven, situadas en la periferia del carrusel de portaobjetos giratorio. Este tipo de disposición está descrito en la patente de EE.UU. 5.947.167 por los mismos inventores, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

El método de añadir y seguidamente lavar reactivos fuera, desde la cámara, es una parte importante de este sistema. Se requiere el efectuar el lavado del reactivo fuera, desde la cámara, después de una incubación, para retirar completamente el reactivo sin reaccionar antes de realizar la siguiente etapa de tratamiento. El lavado implica, habitualmente, el tratamiento de la muestra biológica mantenida sobre el portaobjetos de vidrio, con un exceso de una solución tampón o de una solución de lavado. El reactivo sin reaccionar se diluye en el volumen en exceso de la solución de lavado y se retira por aspiración de la solución de lavado. En este sistema, el lavado de la muestra biológica implica inundar con la solución de lavado, la cámara que contiene la muestra biológica. La solución de lavado se bombea en una puerta de fluidos y se retira desde la otra. Este proceso requiere la presencia de un “inyector de fluidos” y de un “aspirador de fluidos”, cada uno de los cuales se articula con una de las puertas de fluidos. Cada inyector o cada aspirador tiene un émbolo que es capaz de abrir la válvula situada en la puerta de fluidos. El émbolo abre la válvula desviando un cierre de un material elastómero que cierra el orificio de la puerta de fluidos. Con la finalidad de lavar la muestra biológica, un inyector de fluidos impulsa la solución de lavado hacia la cámara. El aspirador de fluidos captura el reactivo después de que ha pasado a través de la cámara. El aspirador de fluidos puede canalizar luego el fluido de lavado residual hacia uno o más depósitos para desecharle finalmente. Este proceso de lavado ocurre en una “estación de lavado” que posee un inyector de fluidos y un aspirador de fluidos. El inyector y el aspirador están montados sobre un mecanismo que los baja y los sube conjuntamente.

La inyección de reactivo en la cámara tiene lugar en una “estación de inyección de reactivos” separada. Se describen dos métodos diferentes para inyectar reactivos. La primera etapa de ambos métodos es que una parte alícuota pequeña del reactivo deseado que ha de inyectarse se coloca en un pocillo de reactivo en la puerta de entrada de fluidos. En el primer método, la estación de inyección de reactivos incluye solamente un inyector de fluidos. El inyector de fluidos está montado sobre un mecanismo que hace bajar el inyector de modo que el inyector se articula con la puerta de fluidos sobre la celdilla. A medida que el inyector de fluidos se hace bajar, forma primeramente un cierre hermético a los fluidos para la puerta de fluidos. El émbolo situado en el inyector abre después la válvula de la puerta de fluidos. Entonces se produce un fuerte vacío momentáneo a través del inyector de fluidos. El vacío se transmite hacia la cámara a través de la puerta de fluidos. La pequeña cantidad de aire existente en la cámara burbujea a través del reactivo existente en el pocillo de reactivo. El vacío del inyector de fluidos es liberado entonces retornando la presión existente por encima del reactivo al nivel de la presión atmosférica. El reactivo es aspirado luego hacia la cámara debido al fuerte vacío residual de la cámara. No se forman burbujas ya que hay poco aire o no hay aire en la cámara para formar burbujas de aire. Alternativamente, el vacío puede provocado a través de una segunda puerta que está cerrada antes de abrirse la puerta para introducir la parte alícuota. En cualquiera de los dos enfoques, el líquido es aspirado hacia la cámara, pero no a través de la cámara, por el vacío.

En otro método de inyección de fluidos, el reactivo se coloca en el pocillo del reactivo, como antes. Un inyector de fluidos se coloca por encima de la puerta de entrada de fluidos. Además, el aspirador de fluidos se coloca por encima de la puerta de salida de fluidos. Las válvulas de ambas puertas de fluidos se abren mediante este procedimiento. El reactivo es impulsado luego hacia la cámara por una ráfaga de presión de aire. La inyección transitoria del reactivo a

ES 2 316 362 T3

alta presión, evita la retención de burbujas al forzar el flujo laminar del reactivo a través de la cámara. Una vez que el reactivo llena completamente la cámara, se retira la presión y se cierran las válvulas desajustando el inyector de fluidos y el aspirador de fluidos.

5 Por tanto, según un aspecto de la invención, un aparato para añadir y retirar reactivos líquidos a y desde una muestra, comprende una superficie plana que mantiene la muestra y una cámara que forma una cavidad sobre la superficie plana, estando la cámara herméticamente cerrada a la superficie plana de modo separable. Pueden añadirse o retirarse fluidos a través de una puerta de fluidos situada en la pared de la cámara. Un origen de presión de aire, negativa o positiva, es proporcionada en un conducto, y un impulsor es capaz de mover la puerta de fluidos y el
10 conducto uno respecto del otro para ajustar mutuamente el conducto y las puertas de fluidos de modo que ambos estén en comunicación de fluidos.

La cámara puede incluir una válvula que está colocada en la puerta de fluidos y el conducto puede incluir, además, un émbolo capaz de abrir la válvula cuando el conducto y la puerta están en comunicación mutua. Una válvula
15 preferida es un elemento flexible por debajo de la puerta que es una extensión de una junta de estanqueidad de la cámara, que produce un cierre hermético contra la superficie plana.

Un pocillo capaz de contener una parte alícuota de reactivo, puede disponerse sobre la puerta de fluidos. Varias cámaras pueden moverse con respecto al impulsor para situar una cámara seleccionada en el impulsor.
20

Otro aspecto de la invención incluye nuevos métodos de aplicación de un reactivo a una muestra. En un método se aplica un vacío a la cámara en la que está colocada la muestra. Una vez que cesa la aplicación de vacío, se deja que el reactivo sea atraído hacia la cámara por el vacío formado dentro de la cámara. En un enfoque preferido, el vacío se aplica a la cámara a través de una parte alícuota de reactivo contenida en un pocillo. Cuando cesa la aplicación del
25 vacío por encima de la parte alícuota, la parte alícuota es atraída hacia la cámara.

Descripción breve de los dibujos

Los objetos anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención, serán evidentes partiendo de la descripción más particular que sigue, de realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos que se acompañan en los que caracteres de referencia iguales se refieren a las mismas partes en todas las diferentes vistas. Los dibujos no están, necesariamente, a escala, haciendo hincapié en su lugar, en que están colocados para ilustrar los principios de la invención.

35 La Fig. 1 es un dibujo en perspectiva despiezado de los componentes que comprenden un alojamiento de un portaobjetos.

La Fig. 2 es un dibujo en perspectiva de un alojamiento de un portaobjetos, montado.

40 La Fig. 3 es una vista de frente despiezada de los componentes de un alojamiento de un portaobjetos.

La Fig. 4 es una vista en corte transversal despiezada del alojamiento del portaobjetos, cortado a través de las líneas A-A, según se ha indicado en la Fig.3.

45 La Fig. 5 es una vista en corte transversal del alojamiento del portaobjetos, totalmente ensamblado.

La Fig. 6 es una vista en corte transversal muy ampliada de la zona encerrada en un círculo de la Fig. 5.

50 La Fig. 7, es una vista en corte transversal muy ampliada del cierre y su relación física con el portaobjetos subyacente y el cubreobjetos de plástico situado por encima.

La Fig. 8 es una representación esquemática de una realización alternativa, no preferida, de un cierre hermético. Se ilustra para destacar las ventajas de la realización preferida del cierre indicado en la Fig. 7.

55 La Fig. 9 es una representación en corte transversal de un inyector de fluidos.

La Fig. 10 es una representación en corte transversal de un inyector de fluidos y de una puerta de fluidos de una celdilla de ISH que están yuxtapuestos uno a otra.

60 La Fig. 11 es una vista en perspectiva de un instrumento de tinción de un portaobjetos.

La Fig. 12 es una representación esquemática de la trayectoria de fluidos encontrado en el instrumento de tinción de un portaobjetos.

65 La Fig. 13 es una representación esquemática de la trayectoria de fluidos para llenar el reactivo, en una realización alternativa.

Descripción detallada de la invención

A continuación se indica una descripción de realizaciones preferidas de la invención.

5 La Fig. 1 muestra una vista despiezada de un montaje completo de un portaobjetos. El montaje ha sido designado como una “celdilla de ISH”, representando “ISH” hibridación *in situ*; sin embargo, puede utilizarse fácilmente para otras aplicaciones tales como las indicadas en Fundamento de la Invención. La celdilla de ISH está compuesta por una cubierta de plástico, 1, y una junta de estanqueidad moldeada, 3. La junta 3 se ajusta en una ranura (no indicada) situada sobre el lado inferior de la cubierta de plástico 1. La celdilla de ISH está situada sobre la parte superior de un portaobjetos de microscopio, 9, que lleva una muestra biológica, 5, montada sobre la superficie del portaobjetos. El portaobjetos de microscopio, 9, descansa sobre una placa calentadora, 7. La placa calentadora está montada con tornillos (no indicado), en una base de alojamiento de portaobjetos, 11. Un elemento calentador resistivo (no indicado) está unido al lado inferior de la placa calentadora 7. La placa calentadora protege al calentador eléctrico de cualquier líquido que pueda derramarse. Más importante, la placa calentadora 7 difunde el calor que procede desde el elemento de calentamiento formando una superficie calentada uniformemente. La masa térmica de la placa calentadora 7 sirve también para estabilizar la temperatura en torno a la temperatura media deseada. Sin suficiente masa térmica, la actuación del elemento de calentamiento puede hacer que la temperatura exceda de la temperatura deseada. Con algo de masa térmica añadida, asociada con la placa calentadora 7, la temperatura se eleva más lentamente de lo que ocurriría de otro modo después de hacer actuar el elemento de calefacción.

20 También se indica en la Fig. 1 un mecanismo de sujeción para mantener la cubierta de plástico 1, la junta de estanqueidad 3, y el portaobjetos de microscopio 9, yuxtapuestos firmemente. Este mecanismo de sujeción es importante para mantener un cierre hermético a los fluidos y al aire entre la cubierta de plástico 1, la junta 3 y el portaobjetos de microscopio 9. El mecanismo de sujeción está formado por la cubierta articulada 17, el resorte alveolar 13, y el pasador 15. Cuando los elementos indicados en la Fig. 1 están totalmente ensamblados, la abrazadera metálica articulada 17 está cerrada de modo que el extremo de la abrazadera, 17, es capturado por el pasador 15. La abrazadera 17 aprieta el resorte alveolar 13 que, a su vez, ejerce presión hacia abajo sobre la cubierta de plástico 1, la junta de estanqueidad 3 y el portaobjetos 9. El resorte 13 ha sido insertado para permitir una variabilidad menor en las dimensiones de las partes indicadas en la Fig. 1. Sin el resorte alveolar 13, se aplicaría demasiado poca presión, fallando con ello la formación de un cierre hermético. Alternativamente, sin él podría aplicarse demasiada presión haciendo que el portaobjetos de microscopio, de vidrio, 9, se rompiera. Mediante el uso del resorte alveolar 13, el mecanismo de sujeción está destinado a ejercer una ligera sobrepresión. La capacidad de compresión del resorte alveolar 13 sirve para amortiguar la fuerza de compresión aplicada por el mecanismo de sujeción, evitando que se rompa el portaobjetos 9.

35 La Fig. 2 muestra el alojamiento de portaobjetos totalmente montado. El mecanismo de sujeción formado por la pinza metálica articulada, 17, el resorte alveolar 13 y el pasador 15, mantiene activamente las partes en la yuxtaposición fijada. Dos puertas de fluidos, 19 y 21, sobresalen por encima de la pinza metálica articulada 17. Una abertura, 2, existente en la cubierta de plástico 1, permite la visión directa de una parte del portaobjetos de microscopio, 9, subyacente. La posibilidad de ver el portaobjetos 9, tiene la finalidad de observar información del paciente o de la muestra que podría haberse colocado en uno de los extremos del portaobjetos 9. Además, permite que un lector de códigos de barras (no indicado) sea capaz de ver un código de barras (no indicado) que pudiera haber sido colocado sobre uno de los extremos del portaobjetos de vidrio, 9.

45 Las Figs. 3 y 4 son vistas despiezadas de frente y en corte transversal de los componentes que se indican en la Fig. 1. Estas vistas demuestran la presencia de dos vástagos de válvulas de material elastómero, 4a y 4b, que forman parte de la misma junta de estanqueidad moldeada, 3. Los vástagos de las válvulas, 4a y 4b, se ajustan en los asientos de las válvulas, 6a y 6b, respectivamente. Los asientos de las válvulas 6a y 6b están formados como rebajes en el lado inferior de la cubierta de plástico 1. Cuando los vástagos de las válvulas, 4a y 4b, se insertan en los asientos de las válvulas, 6a y 6b, los vástagos de las válvulas obstruyen el flujo de fluidos o de aire hacia las puertas de fluidos 19 y 21 o hacia fuera de ellas.

50 Un mejor entendimiento de la operación de las válvulas asociadas con cada una de las puertas de fluidos 19 y 21, puede ser obtenido con referencia a las Figs. 5 y 6. La Fig. 5 es una vista en corte transversal del alojamiento de portaobjetos donde el plano de sección corta a través de los vástagos de las válvulas, 4a y 4b. Una sección transversal muy ampliada de la zona encerrada dentro de un círculo en la Fig. 5, se indica en la Fig. 6. Cuando está totalmente montado, el vástago de la válvula, 4a, ajusta en el asiento de la válvula, 6a, y obstruye el aspecto inferior del cuello 14 de la puerta de fluidos 19. El cuello 14 se asienta en la base de una puerta de fluidos 19 de forma abocinada. Cuando se añade reactivo a la puerta de fluidos 19, la forma abocinada hace que el reactivo se recoja en el fondo de la puerta de fluidos 19, hacia el cuello 14. El reactivo no puede viajar pasado el cuello 14 debido a que el vástago de válvula 4a bloquea el flujo adicional. Si el vástago de válvula 4a, fuera desviado, el reactivo podría entrar en el pasadizo de comunicación, 23. Tal pasadizo 23 conduce al lado inferior de la cubierta de plástico, 1 y el portaobjetos de microscopio, 9.

65 Una vista en corte transversal todavía más ampliada del pasadizo de comunicación, 23, la junta de estanqueidad, 3 y la cámara, se muestra en la Fig. 7. La cámara está encerrada lateralmente por un perímetro formado por la junta 3. En la realización ilustrada, la cámara tiene forma ovalada. Sin embargo, puede tener cualquier forma conveniente. El techo de la cámara está formado por la superficie superior de la cámara, 10, que es, de hecho, la superficie inferior de la cubierta de plástico 1. La superficie superior de la cámara, 10, está ligeramente rebajada (aproximadamente

ES 2 316 362 T3

0,075 mm) con respecto a la superficie inferior de la cubierta de plástico 1 que no está rodeada por la junta 3. La superficie inferior de la cámara, 12, es, en efecto, la superficie del portaobjetos de vidrio, 9. Los cortes de tejidos son, típicamente, mucho más delgados que la altura de la cámara, que está comprendida, preferiblemente, en el intervalo de aproximadamente 0,075 mm a 0,15 mm.

5

La junta de estanqueidad, 3, se ajusta en un rebaje de junta, 16, que está sobre el lado inferior de la cubierta de plástico 1. La junta 3 tiene un borde, 18, que forma una interferencia ajustada entre la superficie superior de la cámara, 10, y la superficie inferior de la cámara, 12. Esta característica es importante para limitar el volumen de reactivo, al evitar que el reactivo alcance el rebaje de la junta, 16, que sirve para fijar la junta de estanqueidad 3. Un método alternativo de hermetización aceptable, aun cuando no preferido, está indicado en la Fig. 8 para ilustrar la ventaja de lo indicado en la Fig. 7. Si se usara una junta tórica, 20, como cierre, el reactivo podría entrar en el rebaje de la junta 16, como ilustra la flecha de la Fig. 8.

15

Algo de reactivo podría desperdiciarse en llenar el volumen vacío del rebaje de la junta, 16.

20

La mayor parte del volumen del rebaje de la junta, 16, estaría ocupado por la propia junta tórica 20. Sin embargo, el rebaje de la junta, 16, es necesariamente mayor que la junta tórica, 20, debido a que la junta tórica 20 necesita deformarse a medida que se aplica presión. Nuestro ensayo ha descrito que el diseño de la Fig. 7 es superior en lo referente a limitar la cantidad de reactivo que se requiere para llenar la cámara.

25

La Fig. 9 es una representación en corte transversal de un inyector de fluidos, 25. En la realización ilustrada y preferida, se usa el mismo diseño para un aspirador de fluidos. El inyector de fluidos 25 está compuesto por un alojamiento del inyector, 27, en el que está insertado un eje metálico roscado, 29. El eje 29 se ajusta en un núcleo central hueco del alojamiento del inyector, 27. La rotación del eje 29 en el sentido de las agujas del reloj hace que el eje 29 se mueva en sentido descendente, profundizando en el núcleo central hueco del alojamiento del inyector, 27. La rotación en sentido contrario a las agujas del reloj hace que el eje 29 se mueva en sentido ascendente. Una ranura, 31, está provista en la parte superior del eje 29 para que puede hacerse girar éste con un atornillador. La interfase roscada existente entre el eje 29 y el alojamiento del inyector, 25, es hermética a los fluidos y al aire. Por consiguiente, el aire o los líquidos situados por encima del eje 29 no pueden comunicarse con el aire o los líquidos situados en la parte inferior del eje 29, por debajo de la interfase roscada. El eje se estrecha formando un émbolo, 33, que sobresale desde la cara inferior del alojamiento del inyector, 27. Existe un pequeño espacio intermedio entre el émbolo 33 y el orificio situado en la cara inferior 35, a través del cual sobresale el émbolo 33.

35

El inyector de fluidos, 25, incluye también un camino para el aire o los fluidos, que comprende una puerta lateral hueca, 39, que comunica con una cavidad del inyector, 37. La cavidad 37, a su vez, está en comunicación con el orificio de la cara inferior, 35, a través del cual sobresale el émbolo 33. El inyector de fluidos, 25, está construido de modo que la presión de aire o de los fluidos aplicada a la puerta lateral 39, se transmite al orificio situado en la cara inferior, 35, a través del cual sobresale el émbolo 33. Tal presión de aire o de fluidos no se ejerce más allá de la interfase roscada situada entre el eje 29 y el cuerpo de plástico 27, debido a que la interfase es hermética al aire y a los fluidos.

40

Una junta tórica, 41, de un material elastómero está montada hacia el fondo del inyector de fluidos 25. Esta junta tórica, 41, es capaz de formar un cierre hermético al aire y a los fluidos cuando se comprime contra una superficie de conformación tal como la puerta de fluidos 19 ó 21. La Fig. 10 muestra la relación existente entre el inyector de fluidos 25 y la puerta de fluidos 19 cuando ambos están yuxtapuestos. La junta tórica 41 aprieta contra la puerta de fluidos, formando un cierre hermético al aire y los fluidos. El émbolo 33 comprime el vástago de la válvula, 4a, desviándole hacia fuera del cuello de la puerta de fluidos 14. Esto abre la válvula y coloca la puerta lateral hueca 39 en comunicación de fluidos y aire con el pasadizo de comunicación 23 y la cámara.

50

La Fig. 11 es una representación en perspectiva de un instrumento, 43, que incorpora posiciones para ocho portaobjetos. El instrumento 43 se muestra con celdillas de ISH en cada una de las ocho posiciones. Cada una de las cubiertas articuladas, 17, está sujeta en sentido descendente por debajo del pestillo 15. Una almohadilla reguladora del calentador, 45, está situada sobre el panel frontal del instrumento 43. La almohadilla reguladora del calentador permite usar el instrumento 43 para entrar la temperatura deseada a la que los calentadores pueden calentarse. También están provistos Interruptores, 47, para desconectar el calor a cualquiera de las posiciones de los portaobjetos que estén vacías. También está previsto que puede incorporarse un circuito de control del calentador, lo que permitirá que cada calentador sea calentado a una temperatura distinta de la de otros calentadores. Tal circuito está descrito en la patente de EE.UU. No. 5.645.114 y en la solicitud de patente de EE.UU. Serie No. 09/032.676, presentada el 27 de Febrero de 1998, ambas de las cuales se incorporan en esta memoria por referencia en sus totalidades. El Instrumento 43 comprende también una plataforma móvil, 49, que se desliza de un lado a otro sobre una pista, 51. La plataforma móvil posee dos impulsores 53 y 55. El impulsor 53 se denomina el "impulsor de lavado" y está conectado a dos inyectores de fluidos por medio de una conexión mecánica, 57, y la conexión 57 se mantiene, normalmente, en una posición hacia arriba mediante dos muelles, 59, montados por debajo de la conexión 57.

65

El impulsor 55 se denomina el "impulsor de llenado" y puede estar conectado a uno o dos inyectores de fluidos, dependiendo del método de llenado de la cámara con reactivo (se describe más adelante). En cada método, una parte alícuota de reactivo se coloca, preferiblemente, en el pocillo de la puerta 19, por ejemplo mediante una pipeta automática, antes de que el conjunto esté situado debajo del activador de llenado. Si solamente se emplea un inyector de fluidos, se usa un inyector ficticio en lugar del inyector de fluidos que está ausente. El inyector ficticio es el alojamiento

ES 2 316 362 T3

cilíndrico del inyector, 27, sin el eje 29 ni el émbolo 33. Este inyector ficticio se usa en ligar del inyector de fluidos para equilibrar la distribución de fuerzas en sentido descendente generadas por el impulsor 55. Los impulsores 53 y 55 están representados como empuñaduras reguladas manualmente. Sin embargo, ha de entenderse que también podrían ser operadas mediante motores, bajo el control de un ordenador. El impulsor, 55, se muestra en la posición “baja” lo que hace que el inyector de fluidos y el inyector ficticio estén yuxtapuestos a las puertas de fluidos 19 y 21. Así pues, cuando el impulsor 55 está en la posición baja, el inyector de fluidos 25 y la puerta de fluidos 19 están en la relación que se indica en la Fig. 10.

También se muestran en la Fig. 11 dos frascos, 61 y 63. Estos frascos están conectados, mediante tubos flexibles (no indicados), a las válvulas 65, 67 y 69 que, a su vez, están conectadas a los inyectores de fluidos 25a-25c (Fig. 12) montados sobre la plataforma móvil 49. Los recorridos para las conexiones de fluidos se muestran en la Fig. 12. La mitad superior de la Fig. 12 describe las conexiones de fluidos para la estación de llenado. La mitad inferior de la Fig. 12 describe las conexiones de fluidos para la estación de lavado. Ambas estaciones requieren un origen de presión de vacío, que no se muestra en el diagrama. Este origen de presión es, lo más convencionalmente, una bomba de vacío. Un colector de distribución, 71, para el vacío, canaliza la fuerza del vacío hacia la válvula 65 y hacia un regulador de presión, 73. La válvula 65 está normalmente en la posición de purga, como muestra la Fig. 12. En ambas estaciones, la de llenado y la de lavado, los inyectores de fluidos están representados en la posición baja, como ilustra la Fig. 10. Como se muestra en la Fig. 12, la fuerza del vacío puede transmitirse a través del colector 71 y la válvula 65, a la puerta lateral, 39, del inyector de fluidos 25a de la estación de llenado. Alternativamente, la válvula 65 puede purgar la puerta lateral 39 del inyector de fluidos 25a, a la atmósfera. El objeto representado como 25d puede ser o bien un inyector “ficticio”, según se ha descrito anteriormente, o bien un inyector construido normalmente.

La fuerza del vacío puede transmitirse también a través del regulador 73 a la válvula 67. La válvula 67 proporciona un conducto a un lado de un frasco de recogida de residuos, 61. El otro lado del frasco 61 está conectado, mediante un tubo flexible, a la puerta lateral del inyector de fluidos 25b. A menos que se opere manualmente, la válvula 67 conecta la puerta lateral 39 del inyector de fluidos 25b con la atmósfera (“purga”). El inyector de fluidos 25c forma parte, también, de la estación de lavado. Su puerta lateral 39 está conectada con la válvula 69 mediante un tubo flexible. La válvula 69 puede o bien purgar el conducto a la atmósfera o puede conectarla con el frasco 63 lleno con solución de lavado. A menos que se opere manualmente, la válvula 69 está conectada normalmente al frasco 63.

El método de llenado y lavado de las cámaras usando este aparato será descrito ahora. La descripción de este método supone que un portaobjetos, 9, está insertado en un alojamiento de portaobjetos y sujeto firmemente, como ya se ha descrito. Una muestra biológica, 5, o un conjunto, asimismo como ya se ha descrito, se coloca sobre la superficie del portaobjetos 9. El objetivo es incubar la muestra con un reactivo durante un período de tiempo definido, como ya se ha descrito, y retirar luego el reactivo mediante un proceso de lavado. Este proceso de lavado, como ya se ha descrito, implica hacer salir el reactivo con un exceso de una solución de lavado. La muestra biológica 5 está contenida dentro de una cámara herméticamente cerrada, cuyos límites ya han sido descritos. En esta sección, se describirá como se lleva a cabo en este contexto el lavado y el llenado de reactivo.

La explicación puede entenderse del mejor modo con referencia a las Figs. 11-12. El lavado de una muestra, 5, sobre un portaobjetos, 9, se efectúa moviendo la plataforma móvil 49 de modo que el impulsor de lavado, 53, se sitúe sobre el portaobjetos 9 deseado. El impulsor 53 se hace bajar manualmente, lo que hace que los inyectores de fluidos 25b y 25c se coloquen en yuxtaposición respecto a las puertas de fluidos 19 y 21. Presionando manualmente el impulsor se hace que los émbolos 33 de los inyectores de fluidos 25b y 25c abran las válvulas asociadas con las puertas de fluidos 19 y 21. Se hace actuar entonces la válvula 67 para conectar el vacío al frasco de residuos, 61. La válvula 69 conecta, normalmente, el frasco de la solución de lavado, 63, con el inyector de fluidos 25c. Por consiguiente, la actuación de la válvula 69 no es necesaria inicialmente. Ejerciendo vacío sobre el inyector de fluidos 25b, la solución de lavado es atraída a través de la válvula 69 y el inyector de fluidos 25c, hacia la cámara formada sobre la parte superior del portaobjetos 9. El fluido circula en la dirección de la flecha indicada en la mitad inferior de la Fig. 12. Después de haber pasado a través de la cámara una cantidad suficiente de la solución de lavado, se hace actuar la válvula 69. Esta actuación hace que la fuerza del vacío impulse aire en vez de solución de lavado, a través de la cámara. Así pues, será aspirada la solución de lavado existente en la cámara, quedando una cámara llena de aire, vacía. La solución de lavado es recogida en el frasco de residuos, 61. El regulador 73 es importante para limitar el caudal de solución de lavado que atraviesa la cámara. Si la presión del vacío es demasiado alta, el alto caudal de solución de lavado que atraviesa la cámara podría, potencialmente, desplazar la muestra biológica 5 sacándola del portaobjetos 9.

Existen al menos dos métodos para llenar la cámara con reactivo para incubar así la muestra biológica 5 con el reactivo. Según el primer método, el inyector de fluidos 25d es, en realidad, un inyector “ficticio” y no abre la válvula de la puerta de fluidos 21 subyacente. En este primer método, una parte alícuota del reactivo se distribuye manualmente a la puerta de fluidos 19. La forma cónica de la puerta de fluidos sirve como depósito para retener el reactivo. Debido a que la válvula asociada con la puerta de fluidos 19 está, normalmente, cerrada, el reactivo no entra inicialmente en la cámara a través de del pasadizo de comunicación 23. El usuario sitúa después la plataforma móvil 49 de modo que el impulsor 55 esté colocado sobre la puerta de fluidos 19 que contiene reactivo. El usuario oprime después el impulsor 55, haciendo que el inyector de fluidos 25a y el inyector ficticio 25d, casen con las puertas de fluidos 19 y 21. Cuando el impulsor 55 es oprimido, el inyector de fluidos 25a, tiene un émbolo que abre la válvula asociada con la puerta de fluidos 19. En este punto, el usuario hace actuar la válvula 65, ocasionando que una fuerza alta de vacío se transmita a través de la válvula 65 y el inyector de fluidos 25a, a la cámara. Con objeto de atraer un fuerte vacío al interior de la cámara, es importante que la junta de estanqueidad 3 forme un buen cierre hermético entre la cubierta de plástico, 1,

ES 2 316 362 T3

y el portaobjetos 9. Además, es importante que la junta tórica 41 forma un buen cierre hermético entre el inyector de fluidos 25a y la puerta de fluidos 19.

5 El aire del interior de la cámara es evacuado. Las burbujas de aire ascienden a través del reactivo que llena la puerta de fluidos 19. Aun cuando se ejerce un alto vacío, la corriente de aire es despreciable debido a que el volumen de la cámara es solo, aproximadamente, 100. Para reducir al mínimo el flujo, el volumen debe ser, preferiblemente, menor que 200 microlitros. Es necesario hacer actuar el vacío durante 1-3 segundos a lo sumo.

10 La válvula 65 se libera después llevándola a su posición normal, estableciendo comunicación con la atmósfera. El reactivo existente en el interior de la puerta de fluidos 19 experimenta entonces la presión atmosférica sobre él y una fuerza de vacío negativa, fuerte, por debajo de él. Esta diferencia de presión arrastra instantáneamente el reactivo hacia la cámara. Dado que existe un vacío cercano en el interior de la cámara, no se forman burbujas de aire en el interior de la cámara. El reactivo es forzado a esparcirse uniformemente, llenando el volumen de la cámara. Debido a que la cámara se llena por sí misma eliminando el vacío a través de la cámara, no es necesario suministrar al pocillo una parte alícuota precisa de reactivo.

20 Un segundo método para llenar la cámara con reactivo está caracterizado en la Fig. 13. Este método requiere que el inyector de fluidos 25d tenga un émbolo 33 capaz de abrir la válvula de la puerta de fluidos 21 subyacente. De conformidad con este segundo método, se añade manualmente reactivo a la puerta de fluidos 19, como antes. La plataforma móvil se mueve también de modo que el impulsor 55 se coloque sobre la puerta de fluidos 19 que contiene el reactivo. Se oprime el impulsor 55 haciendo que se abran las válvulas asociadas con ambas puertas de fluidos, 19 y 21. En este segundo método, un aumento repentino de la presión conduce el reactivo a la cámara ya que la puerta 21 está ventilada. Tal aumento de presión hace que el reactivo entre en la cámara de modo laminar. Alternativamente, un impulso corto de fuerza de vacío podría aplicarse a la puerta 21 para arrastrar reactivo hacia la cámara. En cualquiera de los dos casos, la presión o el vacío deben interrumpirse antes de que el reactivo atraviese la cámara. Todavía, como otra alternativa, el vacío podría ser ejercido a través de la puerta 21 mientras que la válvula de la puerta 19 se mantiene cerrada. Luego la válvula de la puerta 21 podría cerrarse antes de abrir la válvula de la puerta 19 para arrastrar reactivo hacia la cámara.

30 En enfoques anteriores, cuando la única presión que conduce reactivo a una cámara de dimensiones capilares es la acción de mecha de las superficies de la cámara (acción capilar), entonces imperfecciones menores de las superficies de la cámara, o el arrastre de fluido creado por la muestra biológica 5, puede hacer que se formen burbujas. El arrastre de la muestra de tejido frente a la débil flujo por capilaridad, puede ser suficiente para hacer que la corriente pasa en torno a la muestra y converja aguas abajo de la zona de arrastre de fluido, atrapando burbujas de aire sobre la muestra. Si la punta de presión que conduce la corriente de fluido es alta con relación al arrastre de fluido, entonces el arrastre de fluido representa una resistencia menor en comparación con la punta de presión. La elevación de la punta de presión que conduce el reactivo hacia la cámara, por tanto, tiene como resultado el preservar el flujo laminar y evitar que sean retenidas burbujas.

40 Según este segundo método, la válvula 65 se hace actuar eléctricamente para conectarla transitoriamente con el origen de presión. El origen de presión es, lo más conveniente, una bomba de presión unida a un regulador. Tan pronto como el reactivo ha llenado la cámara y salido desde la otra puerta de fluidos 21, la válvula 65 se devuelve a su posición. Un método alternativo para proporcionar una presión repentina, definida, de corta duración, podría ser obtenido mediante una pequeña jeringuilla (que no se muestra). El émbolo de la jeringuilla podría estar conectado a un impulsor eléctrico que le conduciría rápidamente hacia abajo hasta que el émbolo bajara hasta el fondo de la cámara. La embocadura de la jeringuilla podría representar el origen de una creación repentina de presión.

50 Si bien esta invención ha sido mostrada, en particular, y descrita con referencias a realizaciones preferidas de la misma, ha de entenderse por los expertos en la técnica, que pueden llevarse a cabo en la misma diversos cambios en forma y detalles, sin apartarse del alcance de la invención comprendido por las reivindicaciones que se acompañan. Por ejemplo, aunque las válvulas en el conjunto son especialmente eficaces para contener el reactivo en los pocillos, un orificio muy pequeño podría retener el líquido por acción capilar.

55

60

65

ES 2 316 362 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un aparato para añadir y retirar un reactivo líquido a y desde una muestra (15) mantenida sobre una superficie plana (9)

una cámara (1) que forma una cavidad sobre dicha superficie plana, estando dicha cámara cerrada herméticamente a dicha superficie plana de modo que puede separarse;

10 una puerta de fluidos (19, 21) en la pared de dicha cámara a través de la cual pueden añadirse o retirarse fluidos; y un conducto (25) a través del cual puede comunicarse un origen de presión de aire, positiva o negativa;

caracterizado por

15 un impulsor (53, 55) capaz de mover la puerta de fluidos y el conducto una respecto del otro, para ajustar mutuamente dicho conducto y dicha puerta de fluidos, de modo que los dos estén en comunicación mutua de fluido.

2. Un aparato según la reivindicación 1, en el que dicha superficie plana es un portaobjetos de microscopio.

20 3. Un aparato según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que más de una puerta de fluidos está situada en la pared de dicha cámara.

25 4. Un aparato según la reivindicación 3, que comprende, además, un segundo conducto a través del cual puede comunicarse un líquido al menos a una de dichas puertas de fluidos.

5. Un aparato según la reivindicación 1, en el que la pared de la cámara comprende, además, una válvula (4 a, 4b) que está colocada en la puerta de fluidos.

30 6. Un aparato según la reivindicación 5, en el que el conducto comprende, además, un émbolo (33) capaz de abrir dicha válvula cuando dicho conducto y dicha puerta de fluidos están en comunicación mutua.

7. Un aparato según la reivindicación 6, que comprende, además, un pocillo capaz de contener una parte alícuota de reactivo sobre la puerta de fluidos.

35 8. Un aparato según la reivindicación 7, en el que el elemento flexible es una extensión de una junta de estanqueidad (3) de la cámara que hace un cierre hermético contra la superficie plana.

40 9. Un aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, un pocillo capaz de contener una parte alícuota de reactivo sobre la puerta de fluidos.

10. Un aparato según la reivindicación 1, que comprende varias cámaras, moviéndose las cámaras y el impulsor unas respecto del otro, para colocar en el impulsor una cámara seleccionada.

45 11. Un aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la altura de la cavidad es menor que 0,15 mm.

12. Un aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el conducto cierra herméticamente contra la puerta de fluidos.

50 13. Un aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cavidad es de dimensión capilar.

14. Un método de añadir y retirar reactivo líquido a y desde una muestra (15) mantenida sobre una superficie plana (9) separada de otra superficie:

55 cerrando herméticamente de modo que puede separarse, una cámara (1) a dicha superficie plana para formar una cavidad sobre dicha superficie plana;

60 haciendo llegar un fluido a la cavidad a través de la puerta de fluidos con un origen de presión negativa o positiva comunicada a través del conducto,

caracterizado por:

65 un impulsor (53, 55) que mueve un conducto (25) con respecto a una puerta de fluidos (19, 21) para ajustar el conducto y la puerta de fluidos mutuamente, para que los dos estén en comunicación mutua de fluidos.

15. Un método según la reivindicación 14, en el que dicha superficie plana es un portaobjetos de microscopio.

ES 2 316 362 T3

16. Un método según la reivindicación 14 ó la reivindicación 15, en el que más de una puerta de fluidos está colocada en la pared de dicha cámara.

5 17. Un método según la reivindicación 16, que comprende, además, un segundo conducto a través del cual puede comunicarse un líquido a una de dichas puertas de fluidos, por lo menos.

18. Un método según las reivindicaciones 14, 15, 16 ó 17, en el que la pared de la cámara comprende una válvula (4a, 4b) que está colocada en la puerta de fluidos.

10 19. Un método según la reivindicación 18, en el que dicha válvula se abre mediante un émbolo (33) cuando dicho conducto y dicha puerta de fluidos están en comunicación mutua.

20. Un método según la reivindicación 19, en el que la válvula comprende un elemento flexible debajo de la puerta.

15 21. Un método según la reivindicación 20, en el que el elemento flexible es una extensión de una junta de estanqueidad (3) de la cámara que cierra herméticamente contra la superficie plana.

22. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, que comprende, además, contener una parte alícuota de reactivo sobre la puerta de fluidos, en un pocillo.

20 23. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, que comprende mover varias cámaras y mover el impulsor, unas respecto del otro, para colocar una cámara seleccionada en el impulsor.

25 24. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, en el que la altura de la cavidad es menor que 0,15 mm.

25. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24, en el que el conducto cierra herméticamente contra la puerta de fluidos.

30 26. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25, en el que se aplica un vacío a la cámara a través del conducto y, una vez aplicado el vacío, es atraído el reactivo a la cámara por el vacío formado dentro de la cámara.

27. Un método según la reivindicación 26, en el que el reactivo es atraído desde un pocillo formado en el alojamiento de la cámara.

35 28. Un método según la reivindicación 26 ó 27, en el que el vacío se aplica a través de una parte alícuota contenida en el pocillo.

40 29. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que se proporciona una parte alícuota de reactivo en un pocillo sobre la pared de la cámara y, seguidamente, la cámara se mueve a una estación de llenado en la que se aplica el vacío.

30. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 29, que comprende, además:

45 dispensar una parte alícuota de reactivo a un pocillo de reactivo colocado encima de la puerta de fluidos;

proporcionar a la zona un origen de presión de aire por encima del pocillo de reactivo para hacer que dicho reactivo sea impulsado hacia la cámara a través de la puerta de fluidos.

50 31. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 30, en el que se hace que el fluido circule a través de la cavidad, de una parte a otra de la muestra.

32. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 31, en el que la superficie plana está separada de la otra superficie en una altura de dimensión capilar.

55

60

65

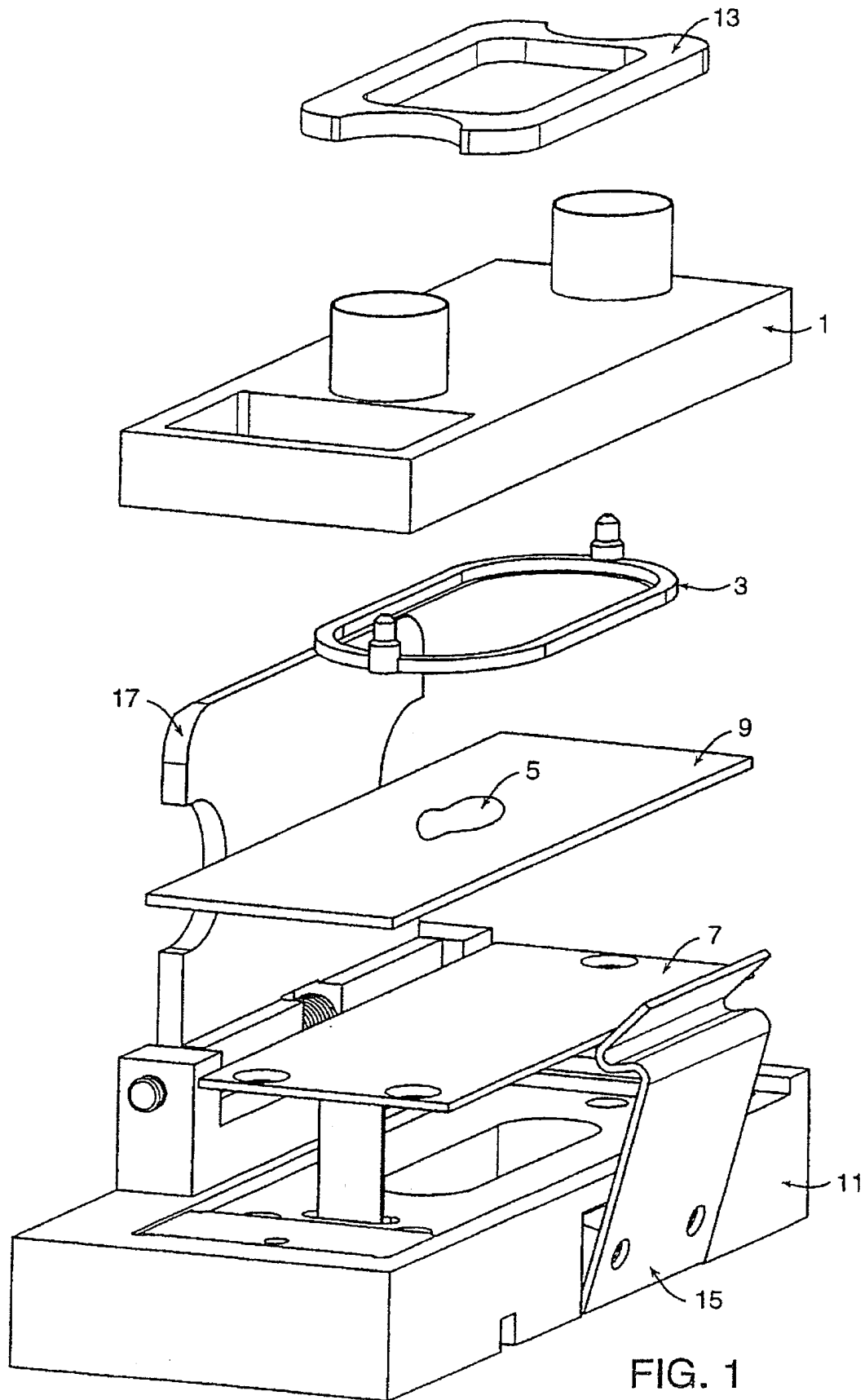


FIG. 1

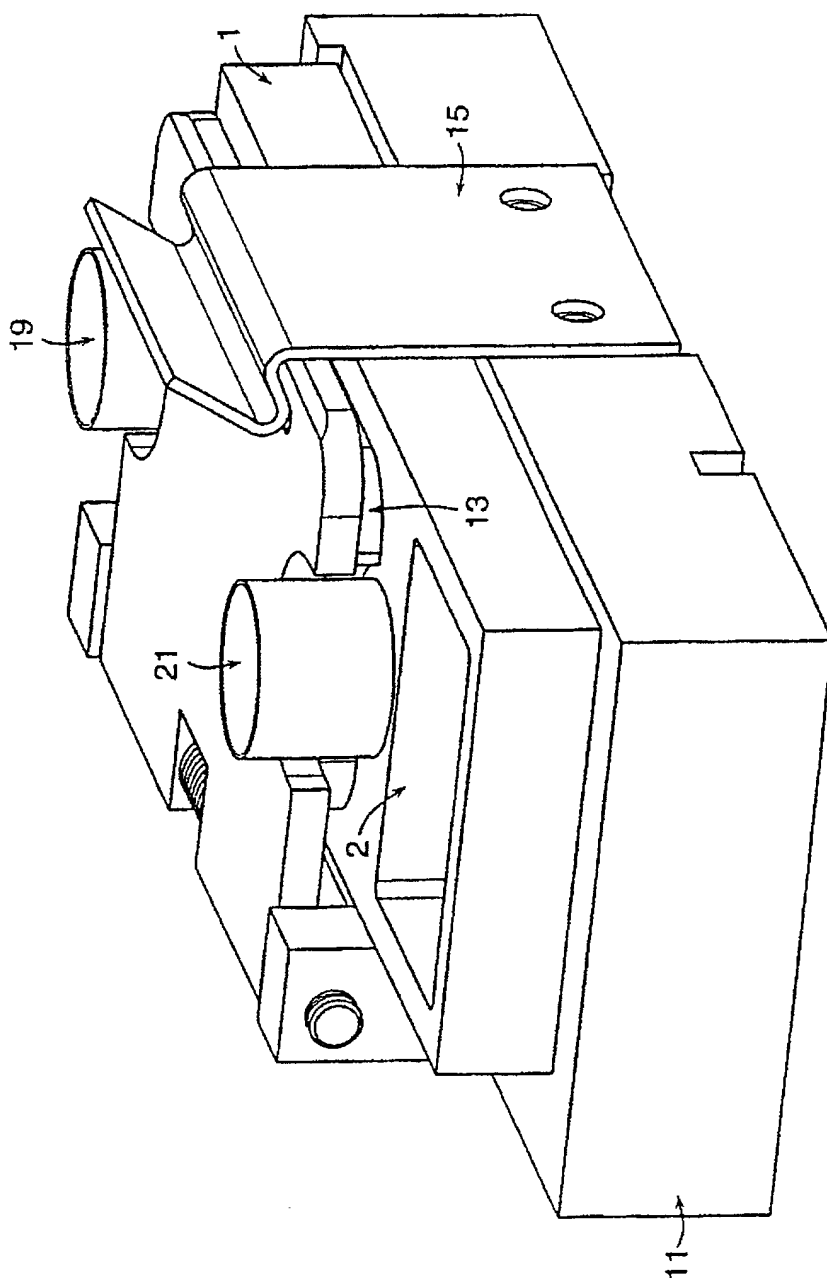
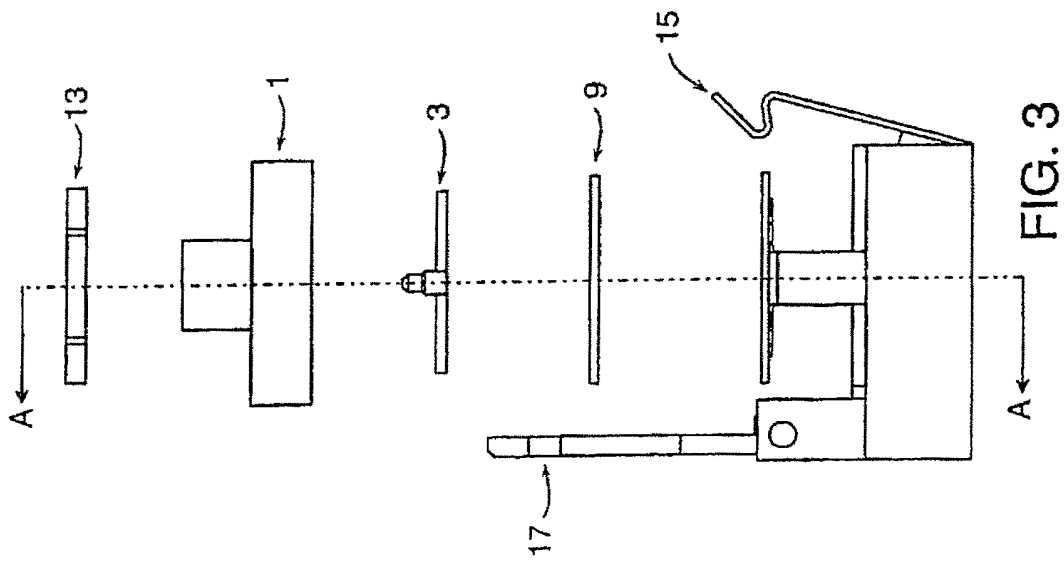
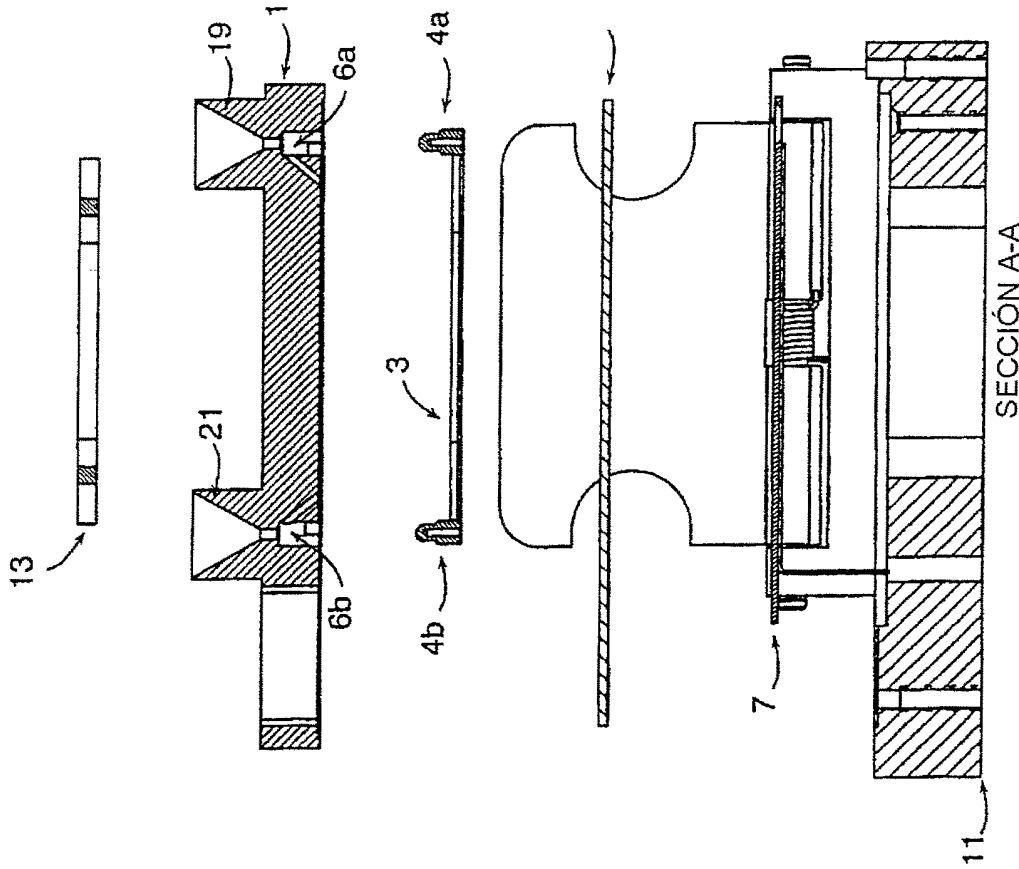


FIG. 2



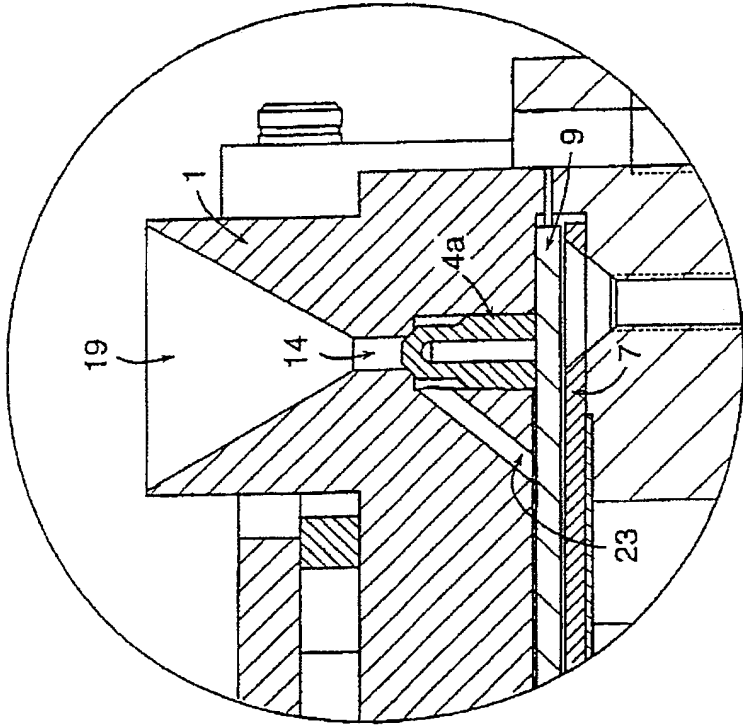


FIG. 6

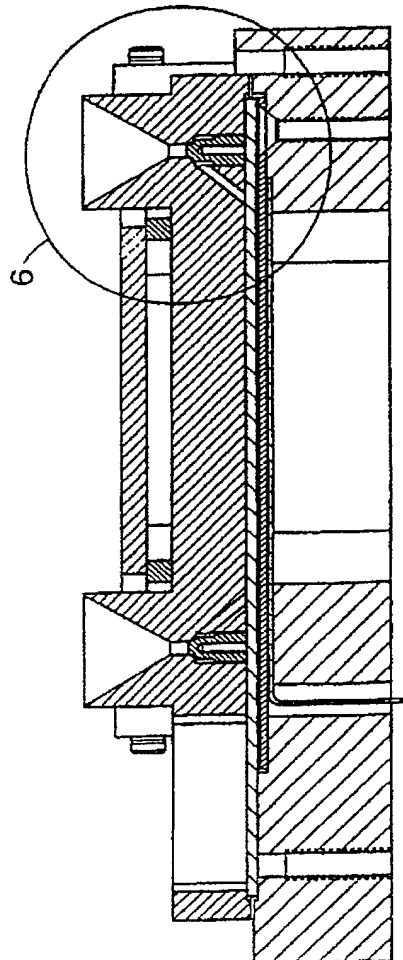


FIG. 5

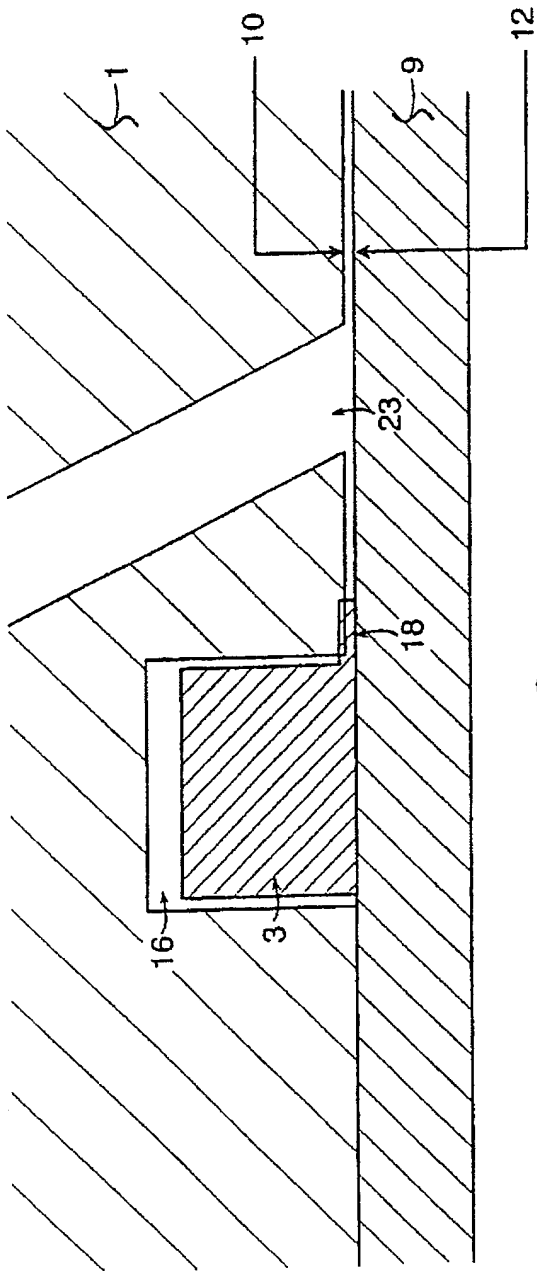


FIG. 7

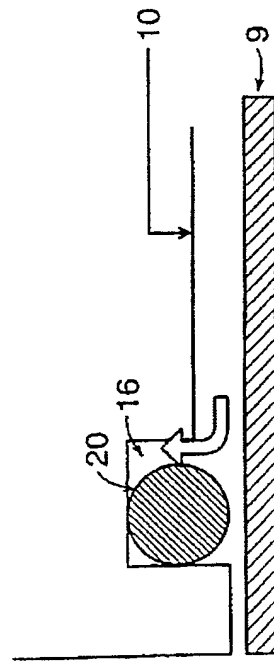


FIG. 8

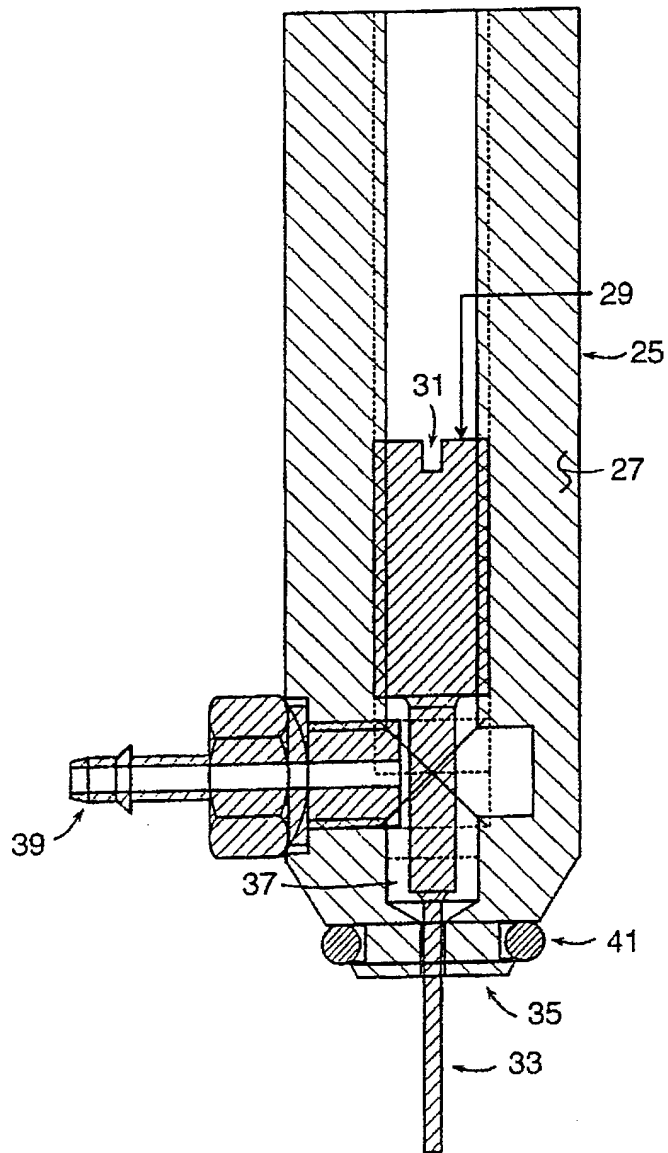
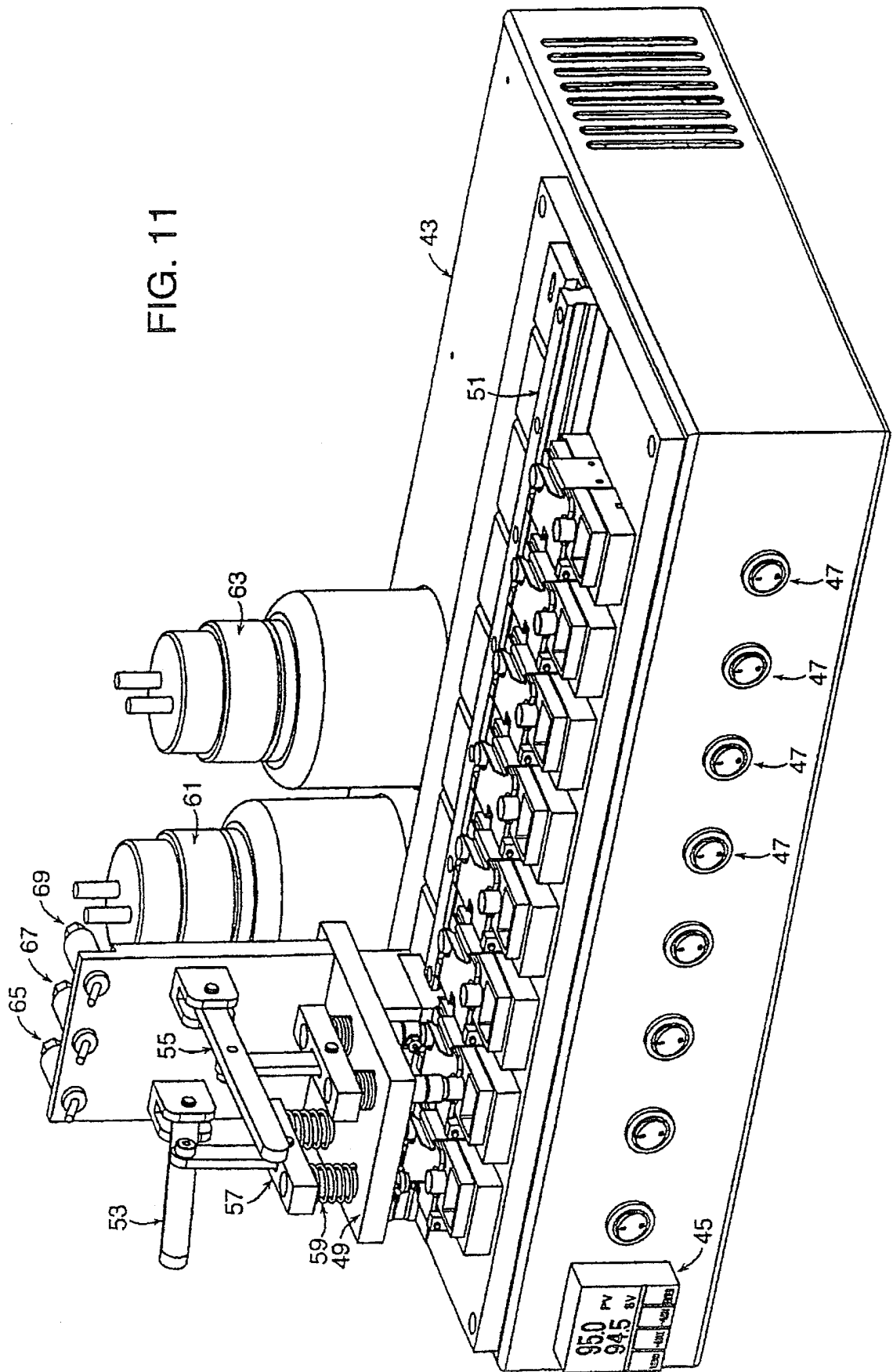


FIG. 9



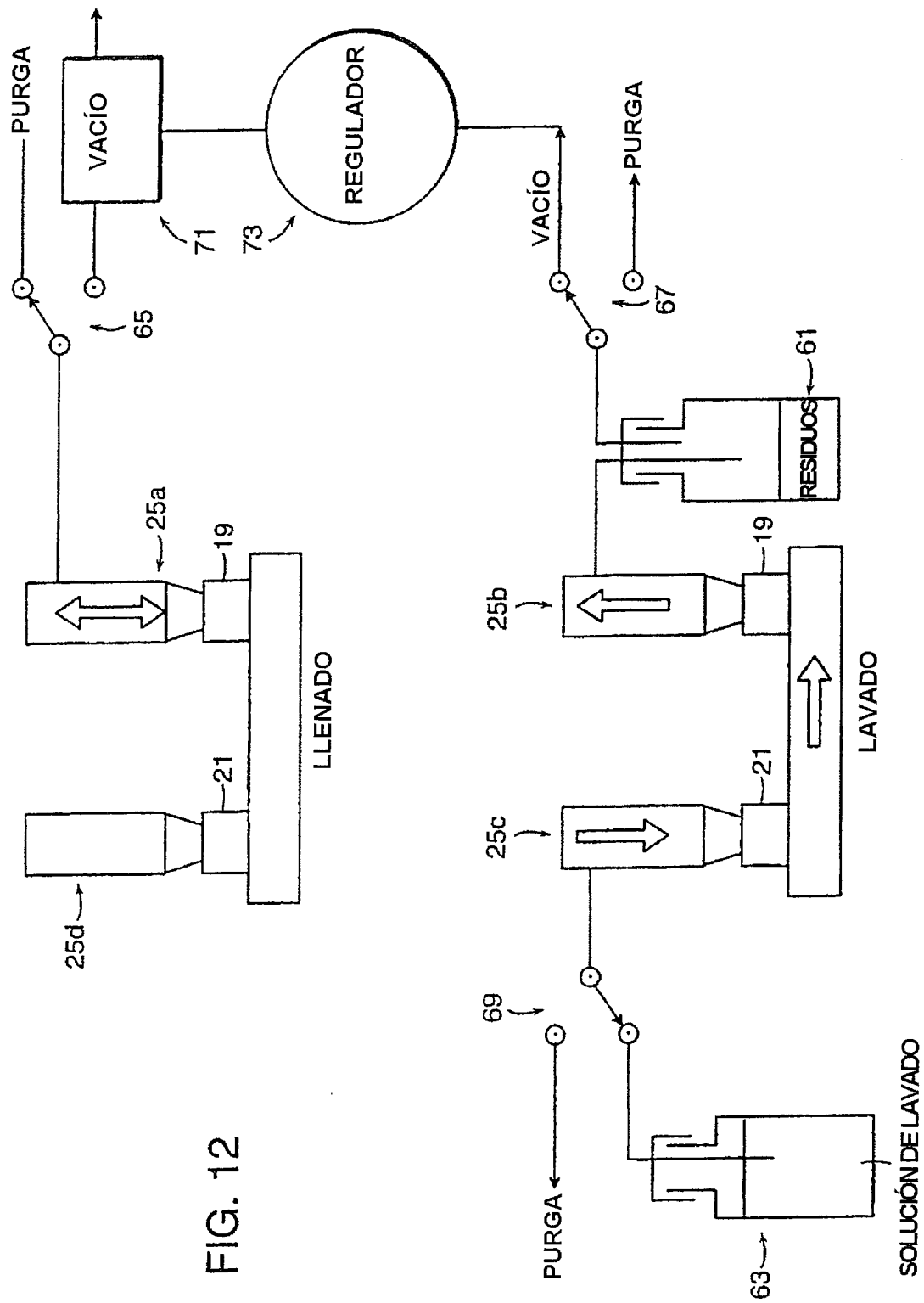


FIG. 12

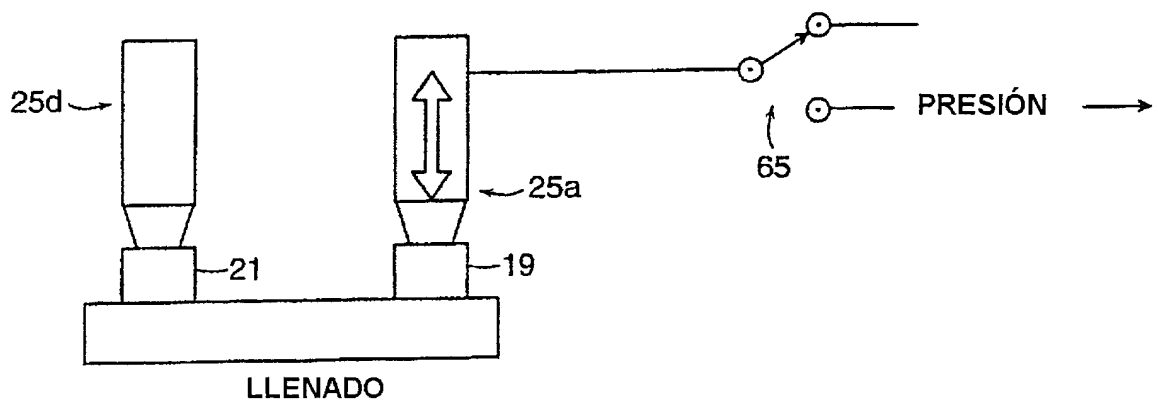


FIG. 13