

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000027884
Data Deposito	29/10/2021
Data Pubblicazione	29/04/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	1	31

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	M	3	06

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	M	1	12

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	M	3	04

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	M	1	26

Titolo

Procedimento migliorato per la processazione di campioni biologici.

DESCRIZIONE dell'invenzione avente per titolo:

“Procedimento migliorato per la processazione di campioni biologici”

a nome: Diapath SpA di nazionalità Italiana

con sede in: Via Savoldini, 71, 24057 Martinengo (BG)

5 Inventori: Carmelo Lupo, Nadia Casatta, Giorgio Manenti, Paolo Danzi, Alberto Battistel, Vladimiro Bergamini, tutti di nazionalità italiana e residenti in Italia.

Riassunto dell'invenzione

La presente invenzione ha per oggetto un procedimento migliorato per la processazione di un
10 campione biologico, in particolare, un procedimento che comprende la rotazione sul proprio asse del detto campione biologico.

Contesto tecnico

La diagnosi anatomo-patologica è il risultato dell'interpretazione da parte
dell'anatomopatologo delle caratteristiche morfologiche, macroscopiche e microscopiche, del
15 campione biologico in esame.

Per fornire una diagnosi accurata e completa, il campione escisso dal paziente deve essere sottoposto ad una serie di trattamenti che hanno lo scopo di assicurare la sua conservazione nel tempo. Tali trattamenti prevedono sostanzialmente:

- i. fissazione;
- 20 ii. disidratazione;
- iii. chiarificazione; e
- iv. infiltrazione in paraffina.

Per la loro processazione, i campioni, all'interno di apposite cassetine, vengono immersi per un certo periodo nel reagente adatto a ciascun trattamento, poi recuperati e immersi nel reagente

per il trattamento successivo.

Con l'intento di migliorare la processazione dei campioni biologici, si sono sviluppati diversi reagenti e tecnologie.

Per quanto concerne i reagenti, la Richiedente ha recentemente depositato due domande di
5 brevetto italiano (IT102020000025159 e IT102020000031031) dirette a delle composizioni che permettono di realizzare simultaneamente i trattamenti di disidratazione, chiarificazione e infiltrazione in paraffina di campioni biologici, ottenendo campioni biologici processati in modo più omogeneo e, contestualmente, risparmiando tempo e solventi.

Relativamente alle tecnologie invece, sono stati proposti dei dispositivi che processano il
10 campione biologico per immersione nel reagente opportuno non in modo statico, come nella processazione convenzionale, bensì in modo dinamico.

US6902928 descrive uno strumento per il trattamento di campioni istologici costruito in modo che i campioni siano disposti lungo le pareti di una camera cilindrica (o a tronco di cono) apribile su una delle due basi in modo tale da poter estrarre i campioni anche in presenza della
15 soluzione con cui vengono trattati che resta sul fondo di detta camera. I campioni vengono immersi nella soluzione grazie alla rotazione della camera stessa che permette di far passare in sequenza tutti i campioni nella zona in cui è presente la soluzione. In questo dispositivo però i campioni non sono immersi nella soluzione in modo continuativo e questo può comportare l'essiccamento del campione stesso con conseguente danneggiamento. Inoltre, la processazione
20 di differenti campioni nella stessa soluzione reagente è causa di contaminazione e può portare ad una analisi errata.

WO2020250121 descrive un dispositivo per promuovere il passaggio di una soluzione reagente attraverso un campione biologico grazie al fatto che detto campione viene movimentato all'interno della soluzione stessa mediante l'utilizzo di uno specifico supporto nel quale viene

alloggiato e sottoposto a un moto di rivoluzione. In questo modo i campioni, alloggiati nel supporto descritto, vengono esposti ad un movimento convettivo della soluzione che permette la penetrazione di quest'ultima all'interno del campione stesso. Anche questa soluzione presenta degli inconvenienti, quali la necessità di utilizzare quantità importanti di soluzioni reagenti e, come nel caso di US6902928, l'alto rischio di contaminazione.

Esiste pertanto ancora la necessità di sviluppare nuove tecniche per la processazione di campioni biologici che superino gli inconvenienti della tecnica anteriore, fornendo dei campioni processati in modo omogeneo in poco tempo, utilizzando quantità minime di reagenti ed eliminando i rischi di danneggiamento e contaminazione degli stessi.

10 **Scopi dell'invenzione**

È uno scopo della presente invenzione fornire un procedimento per la processazione di campioni biologici che permetta la completa e omogenea fissazione e/o disidratazione e/o chiarificazione e/o infiltrazione in paraffina dei detti campioni in modo veloce, utilizzando quantità minime di reagenti e eliminando i rischi di danneggiamento.

15 È un ulteriore scopo della presente invenzione fornire un procedimento per la processazione di campioni biologici che permetta la completa e omogenea fissazione e/o disidratazione e/o chiarificazione e/o infiltrazione in paraffina dei detti campioni eliminando i rischi di contaminazione tra i detti campioni.

Breve descrizione delle Figure

20 La Figura 1 mostra una vista laterale di un esempio di un dispositivo utile nel procedimento dell'invenzione, chiuso.

La Figura 2 mostra una vista dall'alto del dispositivo della Figura 1, privo di coperchio.

La Figura 3 mostra schematicamente la differenza tra il moto a cui viene sottoposto il campione secondo il metodo dell'invenzione (a) e il moto a cui viene sottoposto il campione secondo la

tecnica anteriore descritta in WO2020250121 (b) (vista dall'alto); le frecce indicano la direzione del flusso del liquido determinato dal movimento del campione stesso.

La Figura 4 mostra tre delle possibili configurazioni degli assi attorno ai quali ruota il campione.

Descrizione dell'invenzione

- 5 Secondo uno dei suoi aspetti, l'invenzione ha per oggetto un procedimento per la processazione di un campione biologico che comprende la rotazione intorno al proprio asse del detto campione biologico, immerso in un reagente di processazione.

Secondo la presente invenzione:

- 10 - per "processazione" si intende indicare i trattamenti di fissazione e/o disidratazione e/o chiarificazione e/o infiltrazione in paraffina, siano essi effettuati singolarmente, in sequenza o simultaneamente;
- per "campione biologico" si intende indicare un qualsiasi campione biologico, citologico, istologico e autoptico da sottoporre a un'analisi anatomopatologica;
- 15 - per "rotazione intorno al proprio asse" si intende indicare che il campione biologico è sottoposto ad un moto circolare intorno al proprio asse;
- per "reagente di processazione" si intende indicare un composto o una miscela di composti allo stato liquido, adatti alla processazione di campioni biologici, come qui definita.
- 20 - per "asse" si intende indicare una retta che passa dal centro di massa del campione in un qualsiasi senso, ad esempio in senso longitudinale, trasversale diagonale, sagittale, ecc..

Secondo l'invenzione, nel procedimento dell'invenzione, il campione biologico è posizionato all'interno di un contenitore per campioni biologici.

Secondo l'invenzione, il contenitore per campioni biologici contenente il campione biologico è

posizionato all'interno di recipienti contenenti il reagente di processazione, a loro volta alloggiati in un dispositivo di processazione dotato di mezzi per la movimentazione della cassetina intorno al proprio asse.

Secondo l'invenzione, il contenitore per campioni biologici è fatto ruotare intorno al proprio
5 asse all'interno di un recipiente opportuno, ad esempio ma non limitato a, un recipiente cilindrico, che contiene il reagente di processazione, mediante ogni possibile mezzo adatto allo scopo.

Secondo una forma di realizzazione preferita, mostrata nelle Figure allegate, il contenitore per
campioni biologici contenente il campione è fatto ruotare intorno al proprio asse ad opera di
10 mezzi rotanti collegati al dispositivo di processazione.

Secondo una forma di realizzazione preferita, ciascun campione biologico è processato separatamente dagli altri.

Un contenitore per campioni biologici preferito secondo l'invenzione è una cassetina per
campioni biologici.

15 Con particolare riferimento alla forma di realizzazione delle Figure, una cassetina (1) contenente il campione biologico viene inserita in un recipiente cilindrico (2) che contiene il reagente, e viene movimentata grazie a una o più asticelle rotanti (3); la visione dall'alto riportata nella Figura 2 permette di visualizzare il movimento rotatorio delle cassetine all'interno del detto recipiente. In questo modo, il flusso di reagente investe il campione durante
20 la rotazione intorno al suo asse. Le asticelle ruotano (3) facendo ruotare a sua volta la cassetina contenente il campione biologico, mantenendone il centro di massa fermo.

La rotazione del contenitore per campioni biologici risulta inoltre in un'agitazione continua del reagente; pertanto, anche nel caso in cui si usasse una miscela di reagenti, i componenti di detta miscela si manterrebbero omogeneamente dispersi tra loro permettendo una corretta

processazione del campione.

Come mostrato nelle Figure, a titolo puramente esemplificativo, più campioni possono essere processati contemporaneamente all'interno di un dispositivo adatto allo scopo, ma ogni campione viene preferibilmente processato individualmente, in un singolo recipiente, per evitare rischi di contaminazione. Questa soluzione tecnica rappresenta un importante vantaggio rispetto ai dispositivi della tecnica anteriore.

Come detto, il meccanismo qui descritto con riferimento alle Figure allegate è solamente esemplificativo ed ogni altro sistema che permetta la rotazione del campione sul proprio asse all'interno di un reagente di processazione è incluso nel concetto inventivo e rientra nell'ambito di protezione della presente invenzione.

Secondo una forma di realizzazione, la rotazione del campione può essere effettuata in un qualsiasi senso (verso) o direzione, a seconda di come sia posizionato l'asse di rotazione all'interno del reagente di processazione. A titolo di esempio, il campione può essere fatto ruotare in senso orario o antiorario, e il senso di rotazione può essere alternato durante la processazione. Pertanto, sempre a titolo di esempio, dopo una prima rotazione per un periodo opportuno in un senso, ad esempio in senso orario, la rotazione del campione può essere interrotta e ripresa nel senso opposto, ad esempio in senso antiorario, per un altro periodo opportuno. Questa forma di realizzazione può permettere una processazione ancora più omogenea del campione.

Inoltre, l'asse di rotazione può anche essere variato durante la processazione, mantenendo fisso il passaggio dal centro di massa. Nella Figura 4 sono esemplificati tre delle possibili configurazioni degli assi attorno ai quali ruota il campione.

Il procedimento dell'invenzione, che prevede la rotazione del campione lungo il proprio asse, permette di poter sottoporre il detto campione a velocità di rotazione maggiori rispetto alle

velocità concesse dai metodi della tecnica anteriore. Si è infatti sorprendentemente trovato che con il procedimento dell'invenzione è possibile aumentare sensibilmente la velocità di rotazione del campione pur non provocando alcun danneggiamento o alterazione allo stesso.

Difatti, nel procedimento dell'invenzione, la velocità di rotazione può andare da 50 a 5.000 rpm

5 (rotazioni al minuto), preferibilmente da 100 a 1.000 rpm, ad esempio da 200 rpm fino anche a 300, 400 o 500 rpm, contrariamente al procedimento della tecnica anteriore (WO2020/250121) che utilizza un moto di rivoluzione del campione e non di rotazione intorno al proprio asse (mantenendo quindi fermo il centro di massa), la velocità è di solo 150 rpm. Uno schema della differenza tra il moto di rotazione della presente invenzione e il moto di rivoluzione della
10 tecnica anteriore è fornito nella Figura 3 (rispettivamente indicate come a) e b)).

Secondo una forma di realizzazione preferita, all'interno dell'intervallo sopra indicato, la velocità di rotazione del campione viene modulata, preferibilmente aumentata, durante la processazione. A titolo di esempio, è possibile iniziare la processazione del campione impostando una velocità di rotazione di 250 rpm e aumentarla fino a 450 rpm durante la
15 processazione; a titolo di esempio, la velocità può essere incrementata di 50 rpm ogni 20 minuti circa.

Come detto, il procedimento di processazione dell'invenzione comprende i trattamenti di fissazione e/o disidratazione e/o chiarificazione e/o infiltrazione in paraffina. Tali trattamenti possono essere effettuati singolarmente o in sequenza.

20 I trattamenti di disidratazione e/o chiarificazione e/o infiltrazione in paraffina possono anche essere effettuati simultaneamente.

Secondo una forma di realizzazione, i trattamenti di disidratazione e/o chiarificazione e/o infiltrazione in paraffina sono effettuati simultaneamente utilizzando un reagente di processazione unico. Secondo una forma di realizzazione maggiormente preferita, detto

reagente di processazione unico è quello descritto in IT102020000025159 comprendente paraffina, almeno un alcol scelto tra alcol etilico e alcol isopropilico e almeno un idrocarburo scelto tra nafta e ottano o in IT102020000031031 comprendente paraffina, almeno un alcol scelto tra alcol etilico e alcol isopropilico e almeno un idrocarburo scelto tra isoparaffina e
5 limonene.

I tempi di processazione sono naturalmente variabili a seconda delle dimensioni del campione biologico. A titolo di esempio, dei campioni di circa 3 mm di spessore possono essere processati con una composizione di cui alle due domande di brevetto sopra citate in un tempo di circa 90 minuti.

- 10 L'invenzione sarà ora descritta in dettaglio nella Sezione Sperimentale che segue, titolo puramente illustrativo e in nessun modo limitativo.

Sezione Sperimentale

- 15 Dei campioni di 3 mm di spessore sono stati fissati in formalina 4% e processati per immersione in 40 ml di soluzione costituita da 50% di paraffina, 20% di alcol etilico e 30% di isoparaffina in un apparato come quello di cui alle Figure 1 e 2. I campioni sono stati sottoposti a rotazione alternata sia in senso orario sia antiorario, con una velocità iniziale di 250 rpm, crescendo di 50 rpm ogni 20 minuti, fino alla velocità massima di 450 rpm, per 90 minuti in totale. Il procedimento ha permesso di ottenere un'ottima processazione dei campioni, paragonabile a quella delle lunghe e complesse processazioni tradizionali.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la processazione di un campione biologico che comprende la rotazione intorno al proprio asse del detto campione biologico, immerso in un reagente di processazione.
- 5 2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto campione biologico è posizionato all'interno di un contenitore per l'alleggiamento dei campioni biologici, preferibilmente una cassetta.
3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, caratterizzato dal fatto che detto contenitore contenente il campione biologico è fatto ruotare intorno al proprio asse
10 all'interno di un recipiente che contiene il reagente di processazione, mediante mezzi adatti allo scopo.
4. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, caratterizzato dal fatto che detti recipienti contenenti il reagente di processazione sono alloggiati in un dispositivo dotato di mezzi per la movimentazione di detto contenitore intorno al proprio
15 asse.
5. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, caratterizzato dal fatto che detto campione biologico è processato separatamente da altri campioni biologici.
6. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, caratterizzato dal fatto che detta rotazione è effettuata in un qualsiasi verso o direzione.
- 20 7. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, caratterizzato dal fatto che detta rotazione è realizzata ad una velocità di da 50 a 5.000 rotazioni per minuto, preferibilmente da 100 a 1.000 rotazioni per minuto, più preferibilmente da 200 rotazioni al minuto a 500 rotazioni al minuto.
8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che detta velocità

viene modulata durante la processazione del campione.

9. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, caratterizzato dal fatto che detta processazione comprende i trattamenti di fissazione e/o disidratazione e/o chiarificazione e/o infiltrazione in paraffina, effettuati separatamente, in sequenza o
5 simultaneamente.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che detti trattamenti sono effettuati simultaneamente, utilizzando un reagente di processazione unico.

11. Procedimento secondo la rivendicazione 10, caratterizzato dal fatto che detto reagente di processazione unico è scelto tra

- 10
- una miscela di paraffina, almeno un alcol scelto tra alcol etilico e alcol isopropilico e almeno un idrocarburo scelto tra nafta e ottano;
 - una miscela di paraffina, almeno un alcol scelto tra alcol etilico e alcol isopropilico e almeno un idrocarburo scelto tra isoparaffina e limonene;
 - una miscela di paraffina, alcol etilico e isoparaffina.

Figura 1

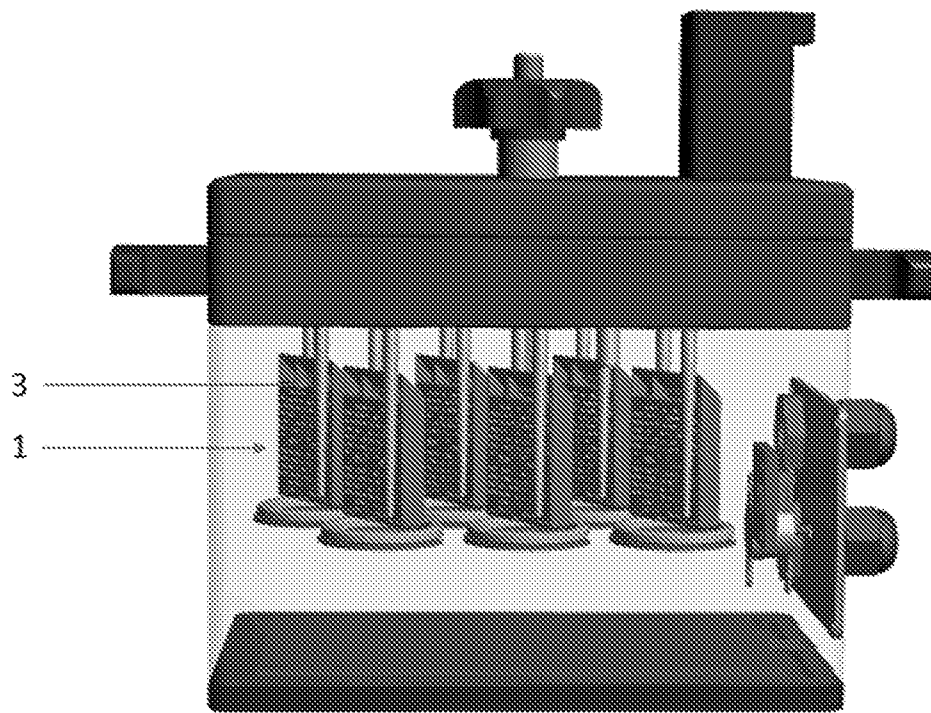


Figura 2

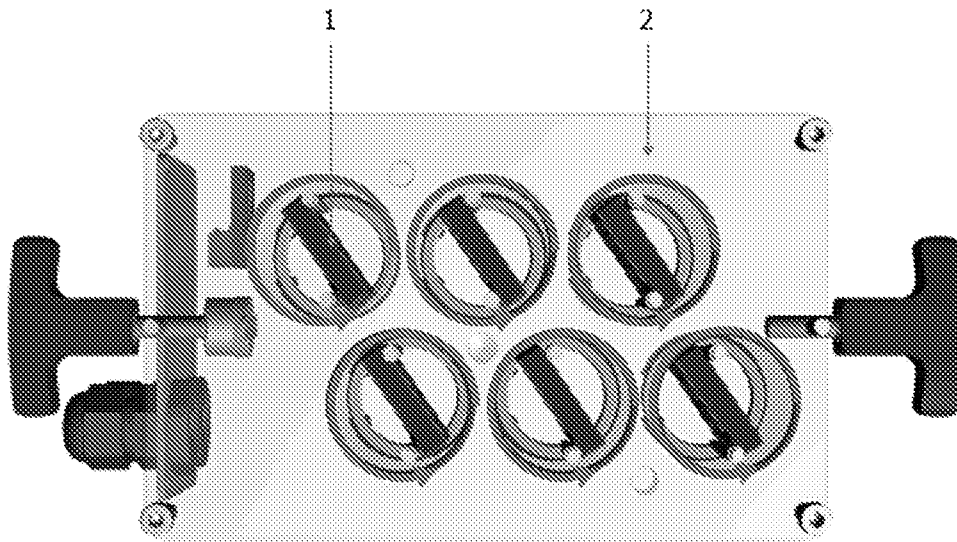


Figura 3

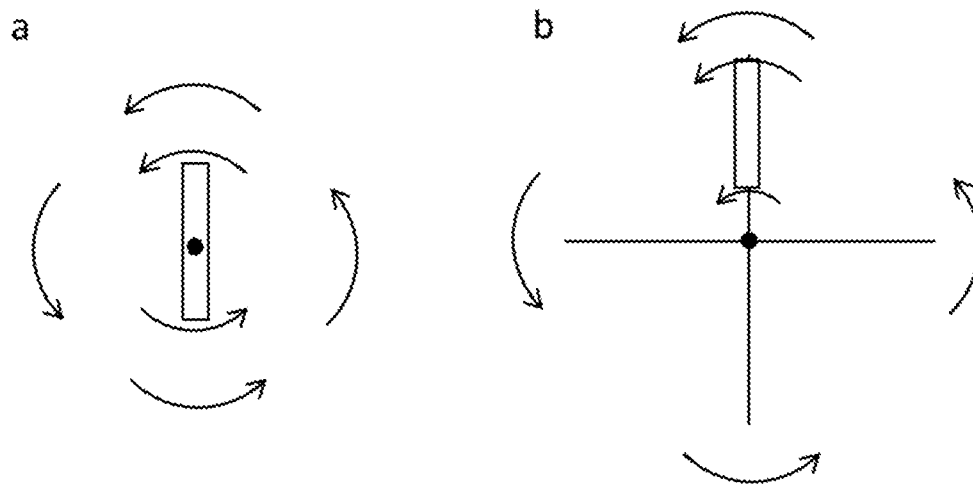


Figura 4

