



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 313 752**

(51) Int. Cl.:

G01N 1/30 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **98940811 .7**

(96) Fecha de presentación : **19.08.1998**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1005633**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2000**

(54) Título: **Un método de fijación-deshidratación-eliminación de grasa-impregnación de tejidos de producción continua, de alta calidad.**

(30) Prioridad: **20.08.1997 US 56102 P**

(73) Titular/es: **The University of Miami
P.O. Box 016960 (M811)
1400 N.W. 10th Avenue
Miami, Florida 33101, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

(72) Inventor/es: **Essenfeld, Ervin;
Essenfeld, Harold y
Morales, Azorides**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

(74) Agente: **Urízar Anasagasti, Jesús María**

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

Un método de fijación-deshidratación-eliminación de grasa-impregnación de tejidos de producción continua, de alta calidad.

5

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al tratamiento de flujo continuo, rápido de tejido para el examen microscópico, desde la fijación hasta la impregnación.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 Los métodos convencionales preparan los tejidos para histología mediante incubación en disoluciones separadas de formaldehído al 10% tamponado con fosfato para la fijación, una serie de concentraciones en aumento de etanol para la deshidratación y xileno para aclarar el tejido del agente de deshidratación, antes de la impregnación. Debido al tiempo requerido para este procedimiento, normalmente 8 horas o más, es habitual completar estas etapas separadas (fijación, deshidratación, aclarado e impregnación) durante la noche en instrumentos mecánicos automatizados diseñados para estas tareas (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 3.892.197, 4.141.312 y 5.049.510).
20 Un procesador automatizado de tejido (TISSUE-TEK) típico requiere más de ocho horas y está programado para tratar lotes de muestras de tejido tal como sigue

Fase	Disolución	Concen.	Tiempo fijado (min.)	Temp. fijada	P/V **	Agitación	Vol. de disol.
1	Formalina tamponada	10%	50	40°C	Activado	Activado	2,2-3,2 litros
2	Formalina tamponada	10%	50	40°C	Activado	Activado	2,2-3,2 litros
3	Alcohol*	80%	50	40°C	Activado	Activado	2,2-3,2 1
4	Alcohol	95%	50	40°C	Activado	Activado	2,2-3,2 1
5	Alcohol	95%	50	40°C	Activado	Activado	2,2-3,2 1
6	Alcohol	100%	50	40°C	Activado	Activado	2,2-3,2 1
7	Alcohol	100%	50	40°C	Activado	Activado	2,2-3,2 1
8	Alcohol	100%	50	40°C	Activado	Activado	2,2-3,2 1
9	Xileno	100%	50	40°C	Activado	Activado	2,2-3,2 1
10	Xileno	100%	50	40°C	Activado	Activado	2,2-3,2 1
11	Parafina		50	60°C	Activado	Activado	4
12	Parafina		50	60°C	Activado	Activado	4
13	Parafina		50	60°C	Activado	Activado	4
14	Parafina		50	60°C	Activado	Activado	4

** - ciclo de presión / vacío

* - el alcohol usado en la mayoría de los laboratorios es una mezcla de alcohol etílico al 90%, metílico al 5% e isopropílico al 5%.

La patente estadounidense US-A-4 656 047 enseña un método para el tratamiento asistido por microondas de una muestra de tejido inferior a 3 mm de espesor que incluye las etapas de fijación y deshidratación en composiciones no acuosas. Cada composición de disolvente representa múltiples etapas a la vez por ejemplo la etapa de deshidratación-impregnación, que elimina la necesidad de aclarar.

5 Tal metodología convencional requiere que las muestras de tejido se envíen desde la sala de operaciones, consulta médica u otros lugares, a un laboratorio de anatomía patológica en un día; que las muestras de tejido se preparen durante la noche; y que el anatomicopatólogo dé un diagnóstico basándose en el examen microscópico de secciones de tejido al día siguiente a primera hora, casi 24 horas tras enviar la muestra al laboratorio (figura 1). Además del retraso mínimo de un día en proporcionar al cirujano el beneficio de un informe del anatomicopatólogo, también existen problemas asociados con el flujo de trabajo limitado en el laboratorio de anatomía patológica exigido por el tratamiento en lotes necesario de las muestras, las preocupaciones de seguridad que suponen los instrumentos que funcionan durante la noche, el riesgo de posibles fallos instrumentales y la necesidad de monitorizar los instrumentos, y el desperdicio de usar grandes volúmenes de reactivos para tal tratamiento cuando se automatiza. Además, se necesitan 10 medidas caras para evitar la exposición del personal de laboratorio a humos y sustancias tóxicas asociadas con los reactivos usados en este procedimiento. Además, el desperdicio de grandes volúmenes de disolvente y el residuo de parafina producidos por la metodología convencional contaminan el medioambiente.

15 15 15

La fijación y el tratamiento convencionales producen un daño irreversible a la estructura del ADN y particularmente 20 del ARN que limita la aplicación de técnicas genéticas para el diagnóstico y la búsqueda. Por consiguiente, la mayoría de los análisis de ADN y por supuesto de ARN requieren precauciones especiales con el manejo del material, tal como congelación inmediata de tejidos frescos, porque el análisis genético retrospectivo se ve afectado por las técnicas de tratamiento de tejido convencionales.

25 El diagnóstico histológico de una sección congelada presenta múltiples desventajas en comparación con las secciones preparadas a partir de bloques de parafina: el portaobjetos preparado a partir de una sección congelada “no posee... uniformidad de calidad”; “es técnicamente más difícil que se examinen secciones en serie de la misma muestra”; “debe procederse con extrema precaución para cortar la muestra con el fin de asegurar una sección suficientemente fina y para evitar la posibilidad de dañar detalles de la muestra”; y todos los portaobjetos deben prepararse “mientras el tejido está en el estado congelado inicial” porque, “[si] el tejido se descongela y se vuelve a congelar para su seccionamiento, se daña gravemente” (patente estadounidense número 3.961.097).

35 Existe un interés siempre presente en acelerar el tratamiento del tejido y el análisis para fines de diagnóstico. Además, un enfoque en asistencia sanitaria reciente se ha referido a la disminución del coste de diversos procedimientos que incluyen el tratamiento del tejido. Los costes del tratamiento del tejido se refieren al tiempo, al espacio requerido para la preparación y el análisis, a los reactivos (tanto la cantidad requerida para el tratamiento como descartar el manejo) y al número de personal requerido. De manera más importante, los pacientes y sus médicos dependen de la evaluación y del diagnóstico por el anatomicopatólogo para que dirija el tratamiento. La reducción de la cantidad de tiempo necesaria para completar el tratamiento del tejido reducirá la ansiedad experimentada durante el periodo entre 40 la obtención de la muestra y la emisión del informe del anatomicopatólogo al cirujano.

45 Otros han reconocido la necesidad de acortar el tiempo requerido para el tratamiento del tejido, pero sólo han efectuado mejoras modestas en los métodos convencionales. Para acelerar el tratamiento del tejido, las patentes estadounidenses números 4.656.047, 4.839.194, y 5.244.787 usan energía de microondas; las patentes estadounidenses 50 números 3.961.097 y 5.089.288 usan energía ultrasónica; y la patente estadounidense número 5.023.187 usa energía de infrarrojos. La patente estadounidense número 5.104.640 daba a conocer una composición no acuosa de un fijador, un agente estabilizador y un agente de solubilización que adhiere un frotis de sangre a un portaobjetos. Sin embargo, las patentes mencionadas no enseñan ni sugieren que el procedimiento total de preparar portaobjetos de tejido de diagnóstico pueda llevarse a cabo en menos de dos horas, comenzando con la fijación y terminando con la impregnación, con producción continua de las muestras. La presente invención proporciona un procedimiento de este tipo.

Sumario de la invención

55 Es un objeto de la invención proporcionar un método y composiciones para el tratamiento del tejido que reduce el tiempo requerido para el tratamiento del tejido y el análisis, y que reduce el coste de los mismos reduciendo el tiempo requerido. Esto permite la conversión de la práctica existente a la histopatología quirúrgica de rápida respuesta para el paciente que se somete a una operación, e incluso puede permitir el análisis de diagnóstico inmediato por el anatomicopatólogo en las inmediaciones de la sala de operaciones.

60 Con respecto al tratamiento y al análisis de tejido sólido, un portaobjetos de tejido debe ser del orden de 4 a 6 micrómetros para examinarse bajo un microscopio, mientras que el corte más delgado de tejido fresco que puede obtenerse cortando es aproximadamente de 1 mm siendo el corte típico del orden de 3 mm. Con el fin de producir un corte suficientemente fino para el examen microscópico, es necesario endurecer el tejido de modo que pueda obtenerse 65 un corte más delgado, por ejemplo, seccionando con un micrótomo. La presente invención acelera enormemente el procedimiento de endurecimiento del tejido y por tanto convierte el tratamiento durante la noche convencional en un procedimiento en total del orden de 40 minutos. Por tanto, se ha desarrollado un método sencillo, seguro, de bajo coste, rápido y fiable que permite la preparación de bloques de tejido impregnado adecuados para el seccionamiento con

ES 2 313 752 T3

micrótomo en menos de dos horas desde el momento en que se recibe el tejido en el laboratorio de anatomía patológica. Este método permite el flujo continuo de muestras, puede adaptarse a la automatización, descarta la necesidad de formalina y xileno con sus humos nocivos, permite la normalización del tratamiento del tejido y requiere volúmenes de reactivos considerablemente más pequeños que los métodos convencionales. Mediante la presente invención pueden procesarse tejidos tanto frescos como previamente fijados.

Además de la reducción en el tiempo requerido para el tratamiento del tejido, la rápida preparación de tejido por la presente invención puede conservar las estructuras de tejido y la morfología que se perdían con métodos convencionales.

Además, estudios con tejidos tratados con la invención dada a conocer en el presente documento indican la mejor conservación de la extracción de ADN y particularmente de ARN que con métodos de tratamiento convencionales. Por tanto, los tejidos obtenidos en hospitales y otros entornos pueden tratarse tanto para estudios histológicos como genéticos poco después de enviar al laboratorio, y material de archivo puede estar disponible para investigación futura y otras aplicaciones. Pueden esperarse mejoras en el campo del material genético, la estabilidad del material genético en forma de archivo, el tamaño y la integridad del material genético y la reducción de la modificación química del material genético en comparación con la técnica anterior.

Un objeto de la invención es proporcionar un método y un aparato para el tratamiento rápido del tejido para histología con producción continua. "Producción continua", significa el acceso al sistema con muestras adicionales, minutos después. Por lo tanto, en cualquier momento dado hay muestras de tejido en diferentes fases de tratamiento. En otras palabras, con este método, hay producción continua y flujo de muestras a lo largo de diversas etapas del tratamiento del tejido. En contraste con este método, actualmente se requiere el tratamiento en lotes porque la metodología convencional tarda ocho horas o más. Las muestras se colocan en instrumentos automatizados, a los que no se puede acceder con muestras adicionales hasta que se completa todo el ciclo de instrumentos. Todas estas muestras de tejido están en la misma fase del tratamiento en cualquier etapa dada del ciclo de instrumentos.

Aún otro objeto de la invención es proporcionar reactivos no acuosos para el tratamiento rápido, de flujo continuo de tejidos para histología.

Un objeto adicional de la invención es eliminar la necesidad de sustancias tóxicas tales como formalina y xileno en el tratamiento de tejidos.

Según un aspecto de la invención, una muestra de tejido se fija, se deshidrata y se le elimina la grasa. Una mezcla adecuada para su uso es una disolución no acuosa que comprende agentes fijadores y de deshidratación, preferiblemente una cetona y un alcohol; la razón en volumen de alcohol con respecto a cetona puede estar entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 3:1. La muestra de tejido se incuba durante aproximadamente 25 minutos o menos, más preferiblemente durante aproximadamente 15 minutos o menos e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 5 minutos o menos. La incubación es preferiblemente entre aproximadamente 30°C y 65°C, más preferiblemente entre aproximadamente 40°C y 55°C, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 45°C y 50°C.

Otro aspecto de la invención es la fijación, la deshidratación, la eliminación de grasa y el aclarado de una muestra de tejido. Una disolución preferida en este aspecto de la invención es alcohol y un agente de aclarado. Este procedimiento puede llevarse a cabo aproximadamente en 5 minutos o menos.

Aún en otro aspecto de la invención, una muestra de tejido se aclara y se impregna en una disolución única que comprende un agente de aclarado y un agente de impregnación. Preferiblemente, este procedimiento puede llevarse a cabo aproximadamente en 5 minutos o menos. Antes del seccionamiento, la muestra de tejido impregnada puede incrustarse en el agente de impregnación.

Una muestra de tejido que se ha fijado, deshidratado y desgrasado puede impregnarse entonces en una disolución de cera. Consecuente con la deshidratación de la muestra de tejido, la disolución de cera tiene preferiblemente el contenido en agua más bajo posible. Por tanto, la disolución de cera puede prepararse antes de la impregnación calentando la cera para evaporar cualquier agua disuelta y desgasificando a presión reducida. La impregnación de la muestra de tejido puede tener lugar a menos de la presión atmosférica del lugar y a temperatura elevada para eliminar cualquier disolvente de la muestra de tejido y extraer la disolución de cera en la muestra de tejido. El vacío disminuye el tiempo de impregnación acelerando la difusión y reduciendo la temperatura de evaporación de cualquier disolvente que pueda estar presente en la muestra. La disolución de cera puede comprender aceite mineral y/o parafina desgasificada. La impregnación de la muestra de tejido puede completarse en aproximadamente 15 minutos o menos; preferiblemente, completarse en aproximadamente 10 minutos o menos. Antes del seccionamiento, la muestra de tejido impregnada puede incrustarse en el agente de impregnación para formar un bloque de tejido.

Otra realización de la invención es el tratamiento de una muestra de tejido desde la fijación hasta la impregnación en una serie de disoluciones, al menos algunas de las cuales son mezclas que realizan más de una tarea al mismo tiempo: fijación, deshidratación, eliminación de grasa e impregnación. La mezcla puede incluir un fijador, un agente deshidratante y un disolvente de grasa (por ejemplo, cetona y alcohol). Otra disolución puede incluir fijador, agente deshidratante, disolvente de grasa y agente de aclarado. Aún otra disolución puede incluir un agente de aclarado y un agente de impregnación. La muestra de tejido puede impregnarse en una disolución de cera compuesta por una mezcla

ES 2 313 752 T3

de diferentes longitudes de cadena (por ejemplo, a temperatura ambiente, aceite mineral que es líquido y parafina que es sólida). Preferiblemente, una mezcla contiene al menos dos productos químicos diferentes (por ejemplo, dos alcoholes).

- 5 El tiempo de tratamiento puede reducirse mediante una mezcla no acuosa (por ejemplo, fijador-agente deshidratante-disolvente de grasa, fijador-agente deshidratante-disolvente de grasa-agente de aclarado, agente de aclarado-agente de impregnación), energía de microondas como fuente para lograr un calentamiento uniforme dentro de la muestra de tejido y la reducción de la presión usando una fuente de vacío. La difusión de la disolución en la muestra de tejido y el intercambio químico pueden favorecerse mediante agitación mecánica, calor, presión reducida o una combinación de los mismos.

10 Las etapas anteriores pueden acelerarse añadiendo un potenciador de la fijación, un tensioactivo o ambos a las disoluciones usadas en el procedimiento. El potenciador de la fijación pueden ser polietilenglicol (PEG), mono y di-metilenglicol, propilenglicol, polivinilpirrolidona o similares; el polímero usado puede tener un peso molecular promedio de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 500, preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 300. El tensioactivo puede ser dimetilsulfóxido (DMSO), ésteres de polioxietensorbitano (por ejemplo, TWEEN 80), dimetilsulfosuccinato de sodio, detergentes domésticos suaves o similares.

- 15 20 El fijador puede ser una cetona (por ejemplo, acetona, metil etil cetona), aldehído (por ejemplo, acetilaldehído, formaldehído, glutaraldehído, glioal), alcohol (por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol), ácido acético, citrato y acetatos de plomo, sales mercúricas, ácido crómico y sus sales, ácido pírico, tetróxido de osmio o similares.

25 La muestra de tejido puede deshidratarse con alcohol metílico, alcohol isopropílico, alcohol etílico, alcohol propílico, butanol, isobutanol, etilbutanol, dioxano, etilenglicol, acetona, alcohol amílico o similares.

- 30 Puede eliminarse grasa de la muestra de tejido con un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, acetona o cloroformo.

35 El agente de aclarado puede ser limoneno, benceno, tolueno, cloroformo, éter de petróleo, bisulfuro de carbono, tetracloruro de carbono, dioxano, aceite de clavo, aceite de cedro o similares.

40 La muestra de tejido puede impregnarse y/o incrustarse en parafina, aceite mineral, ceras no solubles en agua, celodina, polietilenglicos, alcohol polivinílico, agar, gelatina, nitrocelulosas, resinas de metacrilato, resinas epoxídicas, otros medios de plástico o similares.

- 45 En el contexto de la invención, una “muestra de tejido” es un trozo de tejido que puede tratarse mediante los métodos dados a conocer en el presente documento. También puede referirse a células individuales de cualquier líquido biológico (por ejemplo, ascitis, sangre, exudado pleural), o suspensiones celulares obtenidas de la aspiración de órganos sólidos o el lavado de cavidades corporales. Pueden sedimentarse células individuales mediante sedimentación o centrifugación flotante antes del tratamiento.

50 Los métodos de la invención son especialmente adecuados para muestras de tejido en las que debe conservarse el contacto célula-célula, la organización tisular, la estructura de órgano o una combinación de los mismos. Una muestra de este tipo es un corte de tejido preferiblemente de aproximadamente 3 mm o menos en su dimensión más pequeña, más preferiblemente de aproximadamente 2 mm o menos, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,5 mm o menos y lo más preferiblemente de aproximadamente 1 mm o menos.

- 55 La muestra de tejido puede ser fresca, parcialmente fijada (por ejemplo, fijación en formalina al 10% durante 2-3 horas) o fijada (por ejemplo, fijación durante la noche en formalina al 10% o cualquier otro fijador). La invención anterior permite el tratamiento de una muestra de tejido desde la fijación hasta la impregnación en menos de aproximadamente dos horas, preferiblemente menos de aproximadamente 90 minutos, más preferiblemente menos de aproximadamente una hora, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 45 minutos y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 30 minutos. Si la muestra de tejido está fijada o parcialmente fijada, entonces el tiempo de tratamiento puede acortarse en consecuencia. El tejido puede transportarse desde la sala de operaciones hasta el laboratorio de patología en una disolución acuosa; tal disolución de transporte puede consistir en volúmenes iguales de un tampón acuoso y la mezcla no acuosa descrita en el presente documento.

60 Tras la impregnación, la muestra de tejido puede incrustarse para producir un bloque. El agente usado para incrustar la muestra de tejido es preferiblemente el mismo que el material usado para la impregnación, pero también puede usarse un agente de impregnación diferente. La muestra de tejido bloqueada puede montarse sobre un micrótomo para producir secciones de tejido de entre aproximadamente 1 micrómetro y aproximadamente 50 micrómetros, preferiblemente entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 10 micrómetros. Las secciones de tejido pueden tratarse adicionalmente para la tinción histoquímica, unión a anticuerpo, hibridación/amplificación de ácido nucleico *in situ* o una combinación de las mismas. Entonces se examinan normalmente las muestras de tejido mediante microscopía, pero pueden usarse otras técnicas para detectar propiedades celulares para examinar la muestra de tejido tratada (por ejemplo, citometría automatizada, autorradiografía, electroforesis de ácido nucleico).

ES 2 313 752 T3

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra que transcurren casi 24 horas entre el momento en el que se obtiene una muestra de tejido por un cirujano y el momento en el que un patólogo puede preparar un diagnóstico a partir del examen microscópico de secciones del tejido;
- la figura 2 es un diagrama de flujo que muestra que, con la presente invención, puede estar disponible el diagnóstico del patólogo para el cirujano que proporcionó la muestra de tejido en aproximadamente 2 horas o menos;
- la figura 3 es una vista en planta esquemática de una instalación de tratamiento de tejidos para su uso en la invención
- la figura 4 muestra un baño con agitador a modo de ejemplo para su uso en la invención
- la figura 5 muestra un horno microondas a modo de ejemplo para su uso en la invención
- la figura 6 muestra un baño de parafina a modo de ejemplo para su uso en la invención;
- la figura 7 es una ilustración esquemática de una unidad de microondas/impregnación para su uso en la invención;
- la figura 8 es una ilustración esquemática de una guía de corte proporcionada para su uso en la invención
- la figura 9 es una vista en corte de una pinza de tejido y un montaje de corte para su uso en la invención;
- la figura 10 es una ilustración esquemática de un soporte de tejido para su uso en la invención
- la figura 11 es una ilustración esquemática de un portatejidos
- la figura 12 muestra un recipiente que aloja y transporta tejido con el portatejidos para su uso en la invención; y las figuras 13A-13B muestran electroforesis en gel de agarosa de ADN y ARN, respectivamente, preparadas a partir de muestras de tejido tratadas. En la figura 13A, el carril 1 contiene patrones de peso molecular, el carril 2 contiene una muestra diluida de una muestra de tejido tratada según la presente invención, los carriles 3-4 contienen muestras de ADN de muestras de tejido tratadas según la presente invención y los carriles 5-6 contienen muestras de ADN de muestras de tejido tratadas según un método convencional. En la figura 13B: los carriles 1,4 y 6 son blancos, los carriles 2-3 son muestras de muestras de tejido tratadas según un método convencional, el carril 5 contiene una muestra de ARN de una muestra de tejido tratada según la presente invención y el carril 7 contiene ARN control.

Descripción detallada de la invención

Se da conocer un procedimiento y un aparato para el tratamiento histológico continuo, rápido de tejidos. Pueden realizarse las etapas de fijación, deshidratación, eliminación de grasa e impregnación en menos de aproximadamente dos horas; esto permite a un anatomopatólogo evaluar muestras poco después de recibirlas, tal vez mientras el paciente todavía está en la sala de operación o de recuperación. Puede reducirse la ansiedad del paciente reduciendo el tiempo requerido para el diagnóstico anatomopatológico. Se lleva a cabo el tratamiento rápido y continuo mediante la disminución del espesor de las muestras de tejido, uso de disoluciones no acuosas compuestas por mezclas, intercambio de disolución a temperatura elevada y con agitación, calentamiento uniforme de tejidos y disoluciones con radiación de microondas, impregnación en presión de vacío, o una combinación de los mismos.

Se requieren la fijación, la deshidratación y la eliminación de grasa para la preparación de tejido antes de la impregnación. Se facilitan estas etapas recortando el tejido hasta un tamaño adecuado antes del tratamiento y usar soportes que contienen tales bloques de tejido y permite su fácil transferencia entre disoluciones para la fijación, deshidratación, eliminación de grasa e impregnación.

La fijación inicia el endurecimiento de la muestra de tejido y puede conservar la morfología celular reticulando proteínas y deteniendo la degradación celular. Sin la fijación química, las enzimas endógenas catabolizarán y lisarán la célula y la microanatomía del tejido se alterará. Tales fijadores pueden ser una cetona, un aldehído, un alcohol, un ácido acético, metales pesados, ácido crómico, ácido pícrico, o tetróxido de osmio. Indicaciones de que la fijación fue inadecuada pueden incluir: disociación de estructuras de tejido, burbujas en las secciones de tejido, tinción mala e irregular, células contraídas, citoplasma amontonado, condensación y cromatina nuclear menos definida, y autólisis/hemólisis de eritrocitos.

La deshidratación elimina el agua de la muestra de tejido para promover el endurecimiento. La sustitución de agua en la muestra de tejido por un agente de deshidratación también facilita la sustitución posterior del agente de deshidratación por el material usado para la impregnación. Se potencia este intercambio de disolución usando un disolvente volátil para la deshidratación. El agente de deshidratación pueden ser alcoholes de bajo peso molecular, cetonas, dioxano, alquilenglicoles o polialquilenglicoles. El no lograr la deshidratación de la muestra puede conducir a la impregnación inadecuada, mala formación de cinta durante el seccionado, hendiduras en secciones de tejido, disociación de estructuras, cristales de agua en secciones de tejido y mala tinción.

ES 2 313 752 T3

Se elimina la grasa en la muestra de tejido con un disolvente porque la grasa perjudica el aclarado y la impregnación. La eliminación de grasa inadecuada puede dar como resultado la extensión de artefactos de secciones de tejido, arrugamiento de las secciones de tejido y mala tinción.

5 Opcionalmente, se aclara la muestra de tejido. El agente de aclarado extrae el agente de deshidratación de la muestra de tejido y reduce su opacidad. Los ejemplos de agentes de aclarado incluyen limoneno, benceno, tolueno, cloroformo, éter de petróleo, bisulfuro de carbono, tetracloruro de carbono, dioxano, aceite de clavo o aceite de cedro.

10 Finalmente, una vez que la muestra de tejido está fijada y deshidratada de manera adecuada, se endurece mediante impregnación con un agente tal como cera, celoidina, polialquilenglicoles, poli(alcoholes vinílicos), agar, gelatina, nitrocelulosas, resinas de metacrilato, resinas epoxídicas u otros plásticos. Se requiere el endurecimiento apropiado de la muestra de tejido con la conservación adecuada de la morfología celular antes de colocar la muestra impregnada en un bloque y obtener secciones de diez micrómetros o más delgadas con un cuchillo de micrótomo. Los materiales de impregnación preferidos son fórmulas de cera comerciales, mezclas de ceras de diferentes puntos de fusión (por ejemplo, aceite mineral líquido y parafina sólida), Paraplast, Bioloid, Embedol, plásticos y similares. Se ha elegido la parafina para su uso en los ejemplos en el presente documento porque es barata, fácil de manejar y el seccionado de cintas se facilita por la coherencia de estructuras proporcionada por este material.

20 Si el tratamiento de la muestra de tejido está incompleto, los cortes de secciones por el cuchillo del micrótomo aparecerán partidos o "fragmentados". El tratamiento de tejidos se considera que no logra cuando se encuentra uno o más de los siguientes problemas: los bloques de tejido incrustado son demasiado blandos o demasiando duros, las secciones caen o muestran una cantidad de compresión diferente del agente de incrustación, las secciones parecen blandas, no logran formarse cintas de tejido o están torcidas, las secciones se desmenuzan o se rompen, los eritrocitos están lisados o se amontona el citoplasma, condensación de cromatina, tinción basófila del núcleo, células contraídas, extensión de artefactos y efecto apollillado.

30 Para las secciones impregnadas con cera sobre portaobjetos de vidrio, debe fundirse la cera y eliminarse antes de la tinción o inmunohistoquímica. Se vuelve a hidratar la sección de tejido y se analiza entonces tal como se describe a continuación con tintes o anticuerpos. Tras completar la tinción o desarrollar la reacción histoquímica, puede cubrirse con un cubreobjetos el portaobjetos y verse en un microscopio. Alternativamente, puede estudiarse la muestra teñida o marcada con anticuerpo con un instrumento para citometría. Pueden almacenarse los bloques de tejido para fines de archivo o estudios retrospectivos.

35 La presente invención es compatible con la preparación de ácidos nucleicos, ADN o ARN, a partir de tejidos tratados. Por tanto, es posible el estudio genético de muestras recogidas de manera rutinaria en el laboratorio de anatomía patológica clínica. El poder combinado de estas tecnologías será importante. Pueden correlacionarse observaciones histológicas con genéticas analizando una sección mediante tinción o inmunohistoquímica, y preparando los ácidos nucleicos a partir de una sección adyacente para el análisis genético. Por ejemplo, pueden compararse regiones enfermas y normales de la misma sección para detectar diferencias genéticas (por ejemplo, mutaciones, niveles de transcripción), puede caracterizarse la progresión de la enfermedad comparando diferencias genéticas en muestras tomadas en varios puntos de tiempo, y puede evaluarse la evolución del tumor siguiendo el acumulo de diferencias genéticas desde un cáncer primario hasta la metástasis.

45 Muchas características distinguen la presente invención: (a) corte fino de los tejidos antes del tratamiento; (b) entrada continua de muestras de tejido y flujo continuo a través del sistema; (c) eliminación del agua de las disoluciones (es decir, disoluciones no acuosas); (d) fijación, deshidratación, eliminación de grasa, aclarado e impregnación de tejido realizadas con calentamiento uniforme (por ejemplo, energía de microondas); (e) disoluciones de mezclas para fijar-deshidratar-eliminar la grasa, fijar-deshidratar-eliminar la grasa-aclarar y aclarar-impregnar; y (f) impregnación de tejido en presión reducida con agente de impregnación desgasificado. Estas características hacen la presente invención simple, práctica, fácil de poner en práctica y susceptible de automatización.

55 Se usa la tinción de hematoxilina-eosina para estudio histológico y puede considerarse un patrón para la comparación por anatomopatólogos. Además, se ha encontrado que la presente invención es compatible con otros tintes incluyendo tintes de tricromo, reticulina, mucicarmina y elásticos tal como se describen en referencias generales tales como Thompson (Selected Histochemical and Histopathological Methods, C.C. Thomas, Springfield, Illinois, 1966), Sheehan y Hrapchak (Theory and Practice of Histotechnology, C.V. Mosby, St. Louis, Missouri, 1973), y Bancroft y Stevens (Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill Livingstone, Nueva York, Nueva York, 1982). Tales procedimientos de tinción llevarán entre 30 minutos y varias horas para completarse, aunque procedimientos de tinción rápida están disponibles de Fisher Scientific que requieren solamente cinco minutos para llevarse a cabo.

60 65 Puede obtenerse tejido a partir de una autopsia, una biopsia (por ejemplo, biopsia por endoscopia), o a partir de una cirugía. Para cirugía de cáncer, la capacidad de proporcionar un diagnóstico anatomopatológico a partir de una sección de tejido teñida proporcionará al cirujano información que puede usarse antes de la salida del paciente de la sala de operación. Por ejemplo, una indicación del anatomopatólogo de que el cáncer está limitado al tejido resecado puede permitir al cirujano hacer un tratamiento conservador y conservar el tejido sano vecino. Alternativamente, un hallazgo por el anatomopatólogo de que el cáncer no está limitado al órgano resecado permitiría un tratamiento quirúrgico más agresivo mientras que el paciente todavía está en la sala de operación.

ES 2 313 752 T3

Se han tratado más de 20.000 muestras de tejido con éxito mediante la presente invención, incluyendo: cerebro, mama, carcinoma (por ejemplo, intestino, nasofaringe, mama, pulmón, estomago), cartílago, corazón, riñón, hígado, linfoma, meningioma, placenta, próstata, timo, amígdala, cordón umbilical y útero. El tejido mineralizado (por ejemplo, hueso, diente) requeriría descalcificación antes del tratamiento mediante la presente invención. Por ejemplo, puede descalcificarse el tejido con una disolución de ácido clorhídrico/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de Stephens Scientific (Allegiance Healthcare Supply, nº de catálogo 1209-1A) según las instrucciones del fabricante.

También pueden usarse las secciones de tejido tratadas mediante la presente invención en inmunohistoquímica. La presente invención proporciona muestras de tejido en las que se recupera un antígeno y se conserva, puede optimizarse la elección del fijador para la recuperación y la conservación de antígenos particulares. Se bloquean los sitios de unión no específicos, se une el antígeno mediante anticuerpo específico (es decir, el anticuerpo primario) y se elimina el anticuerpo no unido. Si se marca con una sonda o un resto generador de señal, puede detectarse el anticuerpo primario directamente pero se prefiere unir la sonda a una proteína (por ejemplo, un anticuerpo secundario) que se une específicamente al anticuerpo primario. Puede llevarse el anticuerpo secundario frente a la región constante de la cadena pesada o ligera del anticuerpo primario. Esto amplifica la señal generada mediante un conjugado antígeno-anticuerpo porque cada anticuerpo primario se unirá a muchos anticuerpos secundarios. Alternativamente, puede producirse la amplificación a través de otras interacciones específicas tales como biotina-estreptavidina. Se realiza la unión de anticuerpo en un pequeño volumen para reducir la utilización de reactivos caros y mantener una buena tasa de unión; se reduce la evaporación de este pequeño volumen mediante incubación en una cámara de humedad. El resto generador de señal es preferiblemente una enzima que no está presente en el tejido de otra manera. Por ejemplo, pueden unirse fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano al anticuerpo secundario o conjugarse a streptavidina. Están disponibles sustratos para estas enzimas que generan un producto cromogénico, fluorescente o luminiscente que pueden detectarse visualmente.

Puede usarse el patrón de tinción para el antígeno para localizar la expresión del antígeno en el contexto de estructuras celulares reveladas mediante la contratinación. La expresión de antígeno puede identificar el tipo de célula o tejido, la fase de desarrollo, los marcadores de pronóstico de tumores, los procesos metabólicos degenerativos, o infección por un patógeno.

También puede visualizarse la unión antígeno-anticuerpo con sondas radioactivas, fluorescentes o de metal coloidal mediante autoradiografía, microscopía epifluorescente o microscopía electrónica, respectivamente. Pueden usarse sondas similares para detectar ácido nucleico en la sección de tejido mediante hibridación *in situ* para identificar mutaciones genéticas o transcriptos; alternativamente, puede extraerse el ácido nucleico (ADN o ARN) a partir de secciones de tejido y analizarse directamente mediante inmunotransferencia, o amplificarse antes del análisis genético adicional.

Las mutaciones pueden ser germinales y usarse para trazar la predisposición genética a la enfermedad, o las mutaciones pueden ser somáticas y usarse para determinar alteraciones genéticas en la patogénesis de la enfermedad. La enfermedad puede ser un trastorno metabólico o neurológico, tumor maligno, defecto de desarrollo o provocada por un agente infeccioso. La presente invención conserva el material para el análisis genético mediante un procedimiento simple y almacenamiento a temperatura ambiente.

Se prevé que la presente invención conservará el tejido que dará mayores cantidades de ácido nucleico con un peso molecular promedio superior que los tejidos tratados mediante procedimientos convencionales.

Según un sistema a modo de ejemplo para el tratamiento de tejidos proporcionado según la presente invención, puede proporcionarse una serie estaciones de tratamiento de tejidos, por ejemplo, en una única zona o unidad de tratamiento de tejidos. Se ilustra una instalación adecuada de tratamiento de tejidos a modo de ejemplo no limitativo en la figura 3.

La primera etapa en el procedimiento, que puede llevarse a cabo en la instalación de tratamiento de tejidos u otro lugar, es para preparar una muestra de tejido adecuada para el endurecimiento y el examen final. Normalmente, se prepara un corte del tejido de interés. Se obtiene el corte más fino posible, de aproximadamente 1 a 3 mm y preferiblemente de 1 a 2 mm de espesor. El tiempo de tratamiento es proporcional al tamaño del tejido muestra que va a tratarse. Se coloca el corte de tejido en un portatejidos en el que el tejido está contenido durante las etapas de tratamiento inmediatamente siguientes. A continuación se coloca el portatejidos en una primera disolución proporcionada según la presente invención.

A modo de ejemplo, puede colocarse el soporte 10 en un vaso 12 de precipitados convencional, que tiene la primera disolución 14 en el mismo, preferiblemente por sí ya que el tratamiento descrito es uno sustancialmente continuo, o junto con un número limitado de otros, portatejidos similares. Entonces se coloca el vaso 12 de precipitados en un baño 16 con agitador, tal como se ilustra en la figura 4, para agitar suavemente y calentar el mismo. Se usó para este fin un baño con incubador-agitador LAB-LINE/DUBNOFF. En lugar de agua, ya que es nuestro objetivo minimizar la humedad a la que las muestras de tejido están expuestas y, de hecho, en última instancia para deshidratar la misma, se ha proporcionado glicerina como el fluido 18 conductor de temperatura en el baño 16 con agitador. La glicerina tiene la ventaja de ser un conductor eficaz de energía térmica, pero no se evapora. La evaporación aumentaría de modo no deseado la humedad del entorno en el que se trata el tejido, y requeriría reabastecimiento periódico. Porque la glicerina no necesita reabastecimiento ni añade humedad al entorno, es la más preferida. Para esta fase del procedimiento, la muestra de tejido (en el soporte 10) se dispone en la primera disolución, en el baño 18 con agitador durante aproximadamente de 3-15 minutos.

ES 2 313 752 T3

De manera deseable también se proporciona agitación suplementaria durante la etapa de baño con agitador. Actualmente, se proporciona una bomba (A) externa (figura 3) con un tubo (no mostrado) desde la misma insertado en el vaso 12 de precipitados de disolución u otro recipiente para burbujejar y por tanto agitar su contenido. Puede proporcionarse una placa o boquilla de difusión de aeración para proporcionar una agitación de disolución más uniforme

5 según se considere necesario o deseable.

Para garantizar que el portatejidos 10 y los vasos 12 de precipitados que contienen la primera disolución permanezcan erguidos y en una disposición deseada, hemos modificado el baño con agitador convencional para proporcionar alambres o soportes 20 transversales, por ejemplo, cuatro alambres, que definen, por ejemplo, cinco canales longitudinales en los que pueden disponerse vasos 12 de precipitados que contienen portatejidos. Por tanto, por ejemplo, pueden añadirse regularmente vasos 12 de precipitados que contienen muestra al baño 18 con agitador y retirarse a su vez del mismo muestras de tejido tratadas de manera suficiente para un tratamiento adicional tal como se describe a continuación en el presente documento, añadiendo nuevas muestras en el extremo izquierdo del baño con agitador y retirando las muestras tratadas de manera suficiente del extremo derecho del mismo.

10 15 A continuación se expone el portamuestras 10 de tejido a una serie de fluidos mientras se agita simultáneamente y se somete a radiación por microondas. En la realización propuesta actualmente, se proporcionan tres unidades de microondas, tal como se muestra en la figura 3, teniendo cada una una disolución diferente en la que el soporte que contiene muestra de tejido se sumerge durante un periodo recomendado. En la alternativa, puede proporcionarse una única fuente de energía de microondas. Sin embargo, esto requeriría la colocación secuencial de las disoluciones respectivas para recibir el portatejidos. Aunque para una única muestra de tejido tal colocación y sustitución de disolución no aumentaría significativamente la duración del ciclo de tratamiento de tejido, puede apreciarse que el uso de un único microondas que recibe múltiples disoluciones, puede impedir la continuidad del procedimiento con respecto a las muestras posteriores. De hecho, cuando se proporciona una serie de unidades de microondas, a medida que una muestra de tejido dada se mueve de un microondas al siguiente que tiene la siguiente disolución, entonces puede recibirse una muestra de tejido posterior en la primera unidad de microondas. Por tanto, proporcionar una unidad para cada una de las disoluciones respectivas significa que no es necesario mantener en espera una muestra de tejido posterior mientras se han completado todas las etapas de tratamiento por microondas de la muestra anterior. Sin embargo, debe entenderse que con el impedimento de continuidad observado, las tres unidades de microondas ilustradas puede reducirse a dos o incluso una. Igualmente, pueden combinarse o subcombinarse otras etapas en el procedimiento según se considere necesario o deseable desde un punto de vista de equilibrio de continuidad del procedimiento frente a posible reducción en mano de obra, equipo, requisitos de espacio, etc. Una unidad más compacta de este tipo a modo de ejemplo se trata con más detalle a continuación, con referencia a la figura 7.

20 25 30 35 Con referencia ahora a la figura 5, se ilustra una unidad 22 de microondas a modo de ejemplo para el tratamiento del tejido. Para aplicar radiación de microondas, se usan actualmente hornos microondas de laboratorio obtenidos de Energy Beam Sciences, Inc. Se han usado dos modelos de procesador de microondas, H-2800 y H-2500. Puede utilizarse cualquiera de los modelos u otro sistema similar de este tipo. A modo de ejemplo, se utiliza Pyrex u otro recipiente 24 de fluido transparente que puede someterse a microondas para contener respectivamente las disoluciones segunda, tercera y cuarta proporcionadas según la invención en cada una de las tres unidades de microondas (figura 3). Se coloca una sonda 26 de temperatura en la disolución para garantizar que la temperatura del baño respectivo está dentro del intervalo deseado. Además, para proporcionar la agitación, que acelera el tratamiento del tejido, se proporciona aeración. Las unidades microondas que se han usado incluyen un tubo 28 para la aeración. Puede insertarse un único tubo en el baño, pero para una agitación más uniforme y completa, lo que más se prefiere es proporcionar una placa de difusión o cabeza de boquilla (no mostrada en detalle) en colaboración con el tubo 28 de gas para difundir las burbujas de agitación, por ejemplo, a través de una parte sustancial del diámetro del recipiente de disolución para la agitación uniforme de todo el volumen de disolución. Tales boquillas y placas de difusión se conocen bien y pueden proporcionarse, por ejemplo, en la base del recipiente de disolución.

40 45 50 Convencionalmente, se desgasifica parafina como parte del procedimiento de tratamiento del tejido. La desgasificación elimina los disolventes orgánicos de la parafina. Para potenciar este procedimiento, y para volver a utilizar la parafina en el sistema se propone una desgasificación continua. Esto se logra manteniendo el vacío dentro del Pyrex 32 cubierto a 640 mm de Hg.

55 Tras las tres etapas secuenciales que emplean radiación por microondas, se coloca(n) el/los portamuestras de tejido en un baño de parafina, tal como se muestra en la figura 6. Actualmente, se proporciona un baño de parafina que comprende tres estaciones (vasos de precipitados) 30 de baño de parafina dentro de un recipiente 32 Pyrex cubierto. Para los fines de control de la temperatura, el recipiente 32 Pyrex se coloca, por ejemplo, en un baño 34 de agua de marca Poly Science. Aplicando una grasa o similar a los bordes interiores de los flancos tanto en la tapa como en el recipiente, puede proporcionarse un acoplamiento estanco al aire entre la tapa y el recipiente y por tanto puede extraerse un vacío a través de un conector 36 de manguito mecanizado proporcionado en la tapa. Hay recipientes de la marca Pyrex de este tipo adecuadas disponibles de Fisher Scientific. Se usó el modelo número 01-092-25. Para crear un vacío en el recipiente 32 Pyrex, se acopla una bomba 38 de presión/vacío convencional a un tubo 40 que a su vez se acopla a un conector 36. Existe una bomba motorizada adecuada de este tipo disponible de Fisher Scientific y tiene por ejemplo un máximo de 100 psi. Preferiblemente se proporciona agitación durante la etapa de baño de parafina, ya sea mediante agitación por vibración, ultrasonidos o potencialmente mediante aeración.

ES 2 313 752 T3

A continuación debe incrustarse la muestra de tejido. Con ese fin se usa un sistema (I) de consola de incrustación Tissue-Tek convencional (figura 3) disponible de Miles/Sakura, por ejemplo modelo número 4708.

Entonces se corta la muestra de tejido incrustada de una manera convencional con un micrótomo (L) (figura 3) y 5 se hace flotar (M) para su colocación, se usa un instrumento Leitz 1512 Microtome, y el Lipshaw Electric Tissue Float modelo 375.

Tras disponer el corte sobre el portaobjetos, se calienta el portaobjetos para eliminar la parafina. Se usó un instrumento Isotemp Oven de la serie 300 disponible de Fisher (K) (figura 3).

10 A continuación se tiñen los portaobjetos. Para acelerar el procedimiento de tinción, se propone usar un instrumento (O) de tinción automática (figura 3) para reducir el número de personal y tiempo requerido. Un procedimiento no continuo puede usar el instrumento de tinción diversificado de Sakura DRS-601 que tiñe los portaobjetos en lotes; de modo alternativo, un procedimiento continuo puede usar un instrumento de tinción automática de Leica XL que 15 contiene una fase de desparafinado de modo que puede omitirse la incubación separada en un horno. Entonces se cubre la muestra de tejido fijada y teñida, por ejemplo con el cubreobjetos Tissue-Tek, fabricante número 4764 (R) (figura 3).

20 Tal como se describió anteriormente, el sistema para llevar a cabo la deshidratación y la impregnación según la invención puede ser una serie de unidades diferenciadas. En la alternativa, tal como se observó anteriormente, pueden llevarse a cabo una o más etapas en una única unidad o componente de tratamiento. Tal como también se trató anteriormente, el número de unidades proporcionadas y las etapas llevadas a cabo por cada unidad afecta a la continuidad de la unidad de tratamiento. Por tanto, en entornos de poco volumen, una única unidad para llevar a cabo una pluralidad de etapas del tratamiento del tejido puede ser ventajosa y no afectará significativamente a la continuidad 25 del tratamiento del tejido. En entornos de sistemas de mayor volumen, pueden preferirse dos o más unidades.

30 En la figura 7 se ilustra una unidad 42 combinada a modo de ejemplo. La unidad 42 combinada incluye de hecho dos subunidades; una unidad 44 de procesador de microondas y una unidad 46 de impregnador. La unidad 44 de procesador de microondas se proporciona para sumergir secuencialmente el tejido que está tratándose en disolución A, disolución B y disolución C, en cada caso agitando la disolución y exponiendo el tejido a energía de microondas. Por tanto, en la realización ilustrada, se proporciona un recipiente 48 para recibir por ejemplo una o más bandejas 50 sobre las cuales puede colocarse uno o más portatejidos 10. El recipiente 48 está acoplado de manera fluida a una fuente de cada una de las disoluciones para la deshidratación del tejido. Por tanto, una vez colocado(s) el/los portatejidos sobre la(s) bandeja(s) 50 respectiva(s), se transporta disolución A al recipiente 48 y se aplica energía 35 de microondas al mismo de manera simultánea a la agitación por medio, por ejemplo, de un tubo de aireación (no mostrado en la figura 7). Tras haber transcurrido un tiempo de exposición suficiente, se drena la disolución A y preferiblemente se aclaran los portatejidos o bien con disolución B o bien con una combinación de disolución A y disolución B de manera que se elimina sustancialmente la disolución A residual. Entonces se alimenta disolución B al recipiente 48 tras lo cual vuelven a aplicarse energía de microondas y agitación durante un periodo recomendado. Al 40 finalizar la administración de disolución B, se devuelve la disolución B al recipiente de almacenamiento para la misma y se lavan las muestras de tejido o bien con disolución C o bien con una combinación de disolución B y disolución C. Posteriormente, se alimenta disolución C al recipiente 48, se aplican agitación y energía de microondas, y finalmente 45 se drena la disolución C. Entonces las muestras de tejido están listas para la impregnación.

45 En la realización ilustrada la impregnación se lleva a cabo en una segunda subunidad 46 del montaje. Esto permite que se lleve a cabo la impregnación mientras que se somete(n) muestra(s) de tejido a aplicación de energía de microondas. Si se proporciona una única unidad, entonces el recipiente usado para el tratamiento por microondas puede usarse para la impregnación sin embargo no se aplicará energía de microondas al mismo durante las etapas de impregnación.

50 Según el procedimiento de impregnación propuesto, se aplica una serie de disoluciones de parafina, por ejemplo, 3 ó 4, a los portatejidos dispuestos por ejemplo sobre bandejas 52 adecuadas en un recipiente 54, para proporcionar baños de parafina secuenciales para realizar la impregnación de la muestra de tejido como una etapa final en el procedimiento de preparación de tejido. En la subunidad 46 de impregnador, se colocan las muestras de tejido a vacío a una temperatura elevada controlada. Preferiblemente también se agitan las muestras de tejidos durante esta etapa con un 55 agitador magnético, ultrasonidos o burbujeador de aire.

Las etapas de incrustación restantes, etc. de preparación de portaobjetos se llevan a cabo tal como se expuso anteriormente con referencia a la figura 3.

60 Se han desarrollado aparatos e instrumentos especializados para facilitar el tratamiento del tejido en general. Estos instrumentos y aparatos se describen en el presente documento a continuación.

65 Tal como se observó anteriormente, es difícil cortar un corte fino de una muestra de tejido sólida. Por otra parte, es deseable, en cuanto a la minimización del tiempo de deshidratación y de fijación, cortar el tejido lo más finamente posible antes del procedimiento de deshidratación. Para facilitar la creación de un corte fino se han propuesto tres instrumentos para ayudar al anatomopatólogo. Uno, denominado por conveniencia en el presente documento como una guía 60 de corte, tal como se ilustra en la figura 8, está en forma de una placa 62 de metal fina del orden de, por ejemplo, 1 a 2 mm de espesor, que tiene un recorte 64 con un ancho de, por ejemplo, una uña de pulgar (aproximadamente 1

ES 2 313 752 T3

cm²). Se define un tope 66 al final del recorte o muesca 64 para servir como tope de cuchillo o cuchilla. Para facilitar recoger la guía 60 de corte de una superficie lisa y otra superficie de corte, puede proporcionarse un borde 68 en el extremo de la placa 62 de metal, alejado de la muesca de corte. Para proporcionar un corte de tejido fino, se coloca un segmento mayor de tejido sobre el recorte o muesca 64 de modo que se dispone un corte del mismo en la muesca.

- 5 Entonces se aplica presión a la superficie expuesta del tejido y se coloca un instrumento de corte contra, y se desliza horizontalmente a lo largo de, la placa de guía de corte de manera que se corta el tejido dispuesto en la muesca 64 del resto del tejido. El ajuste de la cuchilla de corte con el tope 66 de cuchilla completa el procedimiento de corte y el grueso del tejido, dispuesto sobre el corte, se coloca a un lado. Entonces puede colocarse el resto del tejido, dispuesto en la ranura, en un portatejidos adecuado para la deshidratación y la impregnación.

10 Tal como puede apreciarse, la guía 60 de corte facilita la producción de un corte fino de tejido de espesor generalmente uniforme que puede tratarse adicionalmente.

15 Como otra alternativa para producir un corte fino de tejido, se ha propuesto proporcionar placas o bloques 70 lisos en el extremo de pinzas 72 por lo demás convencionales, tal como se ilustra esquemáticamente en la figura 9. Los bloques pueden fijarse permanente o temporalmente a los extremos de las pinzas. Esto proporciona superficies 74 de apriete lisas, bastante grandes. El tejido que va a cortarse puede colocarse entre los bloques 70 de apriete y una cuchilla afilada que se hace pasar entre los bloques de apriete para cortar el tejido. Cortando cerca de una de las dos superficies 74 lisas generalmente planas, puede proporcionarse un corte de tejido fino de espesor generalmente uniforme. Las 20 superficies lisas paralelas bastante grandes proporcionan una distribución de presión uniforme sujetando así el tejido en posición durante el procedimiento de corte garantizando entonces un corte uniforme que conserva preferiblemente la integridad del tejido.

25 Para sujetar el tejido en posición durante el corte también se ha propuesto un instrumento 92 de tipo tenedor de tres púas, ilustrado en la figura 10. En la realización ilustrada, las púas 94 están separadas entre sí por aproximadamente un centímetro y cada una tiene una punta 96 afilada, puntiaguda para facilitar la penetración del tejido con una perturbación mínima. Al sujetar el tejido en una plancha de cortar con las púas 94 del instrumento 92, pueden obtenerse porciones adecuadas de tejido cortando en paralelo a o entre las púas. En la realización ilustrada, el instrumento 92 se caracteriza porque las púas tienen una longitud del orden de 5-10 cm para adaptarse a una variedad de muestras y 30 un mango de aproximadamente 8 centímetros de longitud, él mismo separado de las púas por 2-4 centímetros, para facilitar la manipulación del instrumento y un agarre seguro durante el corte. Se ha encontrado que el instrumento 92 de tipo tenedor es particularmente ventajoso para obtener secciones de órganos tales como el intestino y la vesícula biliar. De hecho, la fijación de tales muestras con púas 94 evita que las diversas capas de tejido se deslicen entre sí durante el procedimiento de corte.

35 También se ha propuesto proporcionar un soporte y una unidad de recepción de tejido para su uso en la sala de operaciones, para facilitar el transporte de tejido, particularmente segmentos muy pequeños de tejido, por ejemplo los obtenidos mediante biopsia con aguja. Cuando se coloca tal tejido sometido a biopsia directamente, por ejemplo, en un recipiente de disolución adecuada, a menudo puede ser difícil para el técnico de laboratorio retirar la muestra de tejido de un minuto del recipiente y en particular garantizar que se retira todo el tejido sometido a biopsia. Por tanto, 40 tal como se ilustra en las figuras 11 y 12, se ha propuesto proporcionar portatejidos 10' para la sala de operaciones para alojar inmediatamente tales muestras de tejido de un minuto.

45 Para contener tales muestras de tejido dentro del portatejidos 10', se han proporcionado láminas finas de material 80 de esponja de biopsia, que es una espuma plástica de células abiertas, al menos una de las cuales tiene rebajes 82 de profundidad parcial definidos en la misma para proporcionar, junto con la otra esponja de biopsia un compartimento para alojar el tejido sometido a biopsia. Por tanto, en la sala de operaciones puede disponerse el tejido sometido a biopsia inmediatamente en la porción 82 rebajada de las esponjas 80 de biopsia y cerrarse el portatejidos 10'. Para mantener la integridad del tejido para el transporte al laboratorio de tratamiento, se coloca el portatejidos 10' dentro del 50 recipiente de disolución adecuada. Para facilitar la recuperación del soporte y garantizar que se mantiene totalmente sumergido en la disolución, se ha proporcionado un recipiente 86 de muestras que tiene un soporte 88 de columna que sobresale desde la tapa 90 y que tiene una estructura en la punta de la misma 90 para acoplarse con una estructura 84 complementaria en el portatejidos 10'. La figura 12 muestra el portatejidos 10' fijado por su superficie superior. Sin embargo, son posibles puntos de fijación alternativos tales como la superficie inferior o el lado con bisagra del soporte. 55 Además, pueden fijarse dos o más soportes al soporte 88 de columna.

60 Por tanto el portatejidos 10' con el tejido sometido a biopsia en el mismo puede fijarse temporalmente al extremo distal del soporte 88 de columna e insertarse en una disolución adecuada para su transporte. En el laboratorio de tratamiento del tejido, se retira la tapa 90 del recipiente 86 y se retira el portatejidos 10' de la columna 88. Puede proporcionarse cualquier elemento de sujeción adecuado tal como elemento de sujeción de tipo velcro, cierre rápido de plástico, conectores de portaobjetos de cola de milano u otra estructura de ajuste cooperativo para fijar el portatejidos 10' a la columna 88 de soporte. La disolución dentro del recipiente 86 de muestra puede ser una disolución de transporte (acuosa) o la primera disolución (no acuosa). Sería conveniente proporcionar el recipiente de muestra en la sala de operaciones con el soporte fijado al exterior del recipiente y entonces dar la vuelta a la tapa de modo que el soporte se sumerge en la disolución dentro del recipiente tras colocar el tejido dentro del soporte.

65 La presente invención tendrá muchas ventajas sobre métodos convencionales en las áreas de la práctica de patología, atención al paciente, investigación biomédica y educación.

ES 2 313 752 T3

La disponibilidad de diagnóstico microscópico de muestras de tejido en el plazo de aproximadamente 40 minutos a aproximadamente 2 horas tras la recepción permitirá una interacción clínica rápida, o incluso a tiempo real, entre la intervención quirúrgica y la evaluación patológica. Esto puede provocar mejoras significativas en la atención al paciente eliminando o reduciendo hasta un mínimo la ansiedad del paciente durante la espera del diagnóstico de enfermedad, pronóstico y planeamiento de tratamiento.

En consecuencia, habrá una reordenación drástica del flujo de trabajo en los laboratorios de patología. El espacio de laboratorio clínico, experiencia anatomico-patológica, y el personal de oficina y técnico se utilizará más eficazmente. El flujo de trabajo continuo mejorará la accesibilidad y capacidad de respuesta de anatomico-patólogos que tratan y evalúan muestras, reducirá el número de anatomico-patólogos necesarios para tratar y evaluar muestras, y también puede mejorar la educación médica, particularmente la accesibilidad y capacidad de respuesta de programas de residencia.

El volumen menor de reactivos dará como resultado ahorros de coste. La eliminación de formaldehído y xileno y la reducción de requisito de otros productos químicos peligrosos proporcionarán beneficios para el medioambiente y aumentará la seguridad en el laboratorio.

La normalización de los procedimientos de fijación y tratamiento de tejido facilitará la comparación de muestras de diferentes laboratorios. Se eliminarán artefactos en histología debido al uso de formaldehído y/o tratamiento prolongado; permitiendo por tanto una evaluación más precisa de la morfología microscópica de tejidos normales y enfermos. De manera similar, se mejorará la tinción y recuperación de antígenos. Para el análisis genético, se eliminarán las mutaciones de ADN inducidas por formaldehído y puede potenciarse la extracción de ácido nucleico a partir de material de archivo. La viabilidad de estudios de ARN a partir de tejido almacenado, incrustado en parafina, fijado abre caminos ilimitados para aplicaciones de diagnóstico y de investigación.

Se pretende que los siguientes ejemplos sean ilustrativos de la presente invención; sin embargo la práctica de la invención no se limita de ninguna manera a los mismos.

Ejemplos

30 Ejemplo 1

De referencia, no según la presente invención

Se guardaron cortes de dos mm de espesor o más delgados de tejido fresco o fijado previamente en portatejidos y se colocaron en una primera disolución no acuosa de:

alcohol isopropílico al 40%,

acetona al 40%,

40 polietilenglicol al 20% (peso molecular promedio 300), y

dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% (es decir, 10 ml por litro de la mezcla anterior).

45 Se incubaron las muestras de tejidos durante 15 min. a una temperatura de baño de glicerina entre 45°C y 50°C. Se colocó la disolución de 400 ml para la fijación en un vaso de precipitados de 500 ml en un agitador de baño de agua (desplazamiento lineal de 5 cm/s). Se proporcionó agitación adicional de la disolución de fijación burbujeando con una bomba de aire.

50 Se llevan a cabo la fijación, deshidratación, eliminación de grasa, aclarado e impregnación mediante exposición secuencial de la muestra de tejido a tres disoluciones diferentes (las segunda, tercera y cuarta disoluciones descritas anteriormente), una en cada uno de los tres hornos microondas de Energy Beam Sciences. Se coloca una disolución de un litro de alcohol isopropílico al 70% y polietilenglicol al 30% (peso molecular promedio 300) en el primer horno (modelo H2800) en un vaso de precipitados de 1500 ml, la disolución en el segundo horno (modelo H2800) consiste en un litro de alcohol isopropílico al 70% y de xileno al 30% en un vaso de precipitados de 1500 ml, y el tercer horno (modelo H2500) contiene una disolución de 1000 ml de xileno y 300 g de parafina en un vaso de precipitados de 1500 ml. Se añaden diez ml de DMSO por litro a estas tres disoluciones. Se realiza el calentamiento a 60°C mediante radiación de microondas durante 15 minutos en el primer horno, y durante 5 minutos en cada uno de los segundo y tercer hornos (fijándose al 75% de potencia con un ciclo de 2 segundos).

60 Para continuar la impregnación con parafina tras completar las etapas de radiación de microondas, se incubaron las secciones de tejido en cuatro baños de 500 ml de parafina fundida dentro de un desecador grande cargado con parafina que está apoyado en un baño de glicerina a 75°C. Se transfirieron las secciones de tejido desde un baño de parafina hasta el siguiente a intervalos de 3 minutos, durante un tiempo de impregnación total de 12 minutos. Se midió cada intervalo de 3 minutos a partir del tiempo en el que la lectura de presión era de aproximadamente 640 mm de Hg. No se usó agitación durante esta etapa.

ES 2 313 752 T3

Ejemplo 1

Se llevaron a cabo la fijación, deshidratación, eliminación de grasa e impregnación con parafina de secciones de tejido frescas o fijadas, de aproximadamente 1 mm de espesor, en 40 minutos mediante la exposición de estas secciones de tejido a cuatro etapas sucesivas tal como sigue.

Etapa 1

En este ejemplo, la primera disolución consistía en:

- alcohol isopropílico al 60%,
acetona al 10%,
polietilenglicol al 30% (peso molecular promedio 300), y

dimetilsulfóxido (DMSO) añadido a una concentración aproximada del 1% del volumen total. Un litro de esta disolución es suficiente para fijar 60 muestras de tejido contenidas en portatejidos. Se incubaron las muestras a 55°C en un procesador comercial de microondas para tejidos (H2500 o H2800, Energy Beam Sciences) durante 5 min. en cada una de las series de tres baños que contenían la primera disolución (incubación total de 15 min.); se obtuvo la agitación de la disolución burbujeando para acelerar el intercambio de disolución.

Etapa 2

Se incubaron las muestras en una disolución de alcohol isopropílico al 70%, acetona al 30%, y DMSO añadido a una concentración aproximada del 1% a 60°C. Se calentaron las muestras en un procesador de microondas para tejidos (H2800, Energy Beam Sciences) durante 5 min. en cada uno de los dos vasos de precipitados que contenían la disolución (incubación total de 10 min.), que se agitaron burbujeando.

Etapa 3

Tras la irradiación de microondas, se inició la impregnación mediante incubación en una disolución de cera de aceite mineral al 25% y de parafina fundida al 75% colocada en un desecador grande que está apoyado en un baño de glicerina a 60°C o 70°C, a vacío de aproximadamente 200 mm de Hg, durante 5 min. Se desgasificó la parafina antes de su uso tal como se describe en el ejemplo 1.

Etapa 4

Se completó la impregnación mediante incubación en cuatro baños de parafina fundida colocados dentro de un desecador grande que está apoyado en un baño de glicerina a 75°C. Se transfirieron las secciones de tejido desde un baño de parafina hasta el siguiente s intervalos de 3 min., durante un tiempo de total de impregnación de 12 min. Se midió cada intervalo de tres min. para el tiempo en el que la lectura de presión es de aproximadamente 640 mm de Hg.

En este ejemplo se añadieron 6 ml de una disolución madre de indicador de color (10 g de azul de metileno en 1000 ml de alcohol isopropílico) a cada una de las disoluciones de alcohol isopropílico y acetona. Las muestras de tejido adquieren una tinción azul que facilita su manejo durante la impregnación y manejo; también puede monitorizarse la penetración de la muestra de tejido mediante la observación de un color azul uniforme a lo largo de la muestra de tejido.

Ejemplo 2

Pueden llevarse a cabo la fijación, deshidratación, eliminación de grasa e impregnación con parafina de secciones de tejido frescas o fijadas, de hasta aproximadamente 1 a 2 mm de espesor, en 65 minutos tal como sigue.

Etapa 1

En este ejemplo, la primera disolución consiste en:

- alcohol isopropílico al 40%,
acetona al 40%,
polietilenglicol al 20% (peso molecular promedio de 300),
ácido acético glacial añadido a una concentración aproximada del 0,5% del volumen total, y

ES 2 313 752 T3

5 dimetilsulfóxido (DMSO) añadido a una concentración aproximada del 1% del volumen total. Un litro de esta disolución es suficiente para fijar 60 muestras de tejido contenidas en portatejidos. Se incuban las muestras a 65°C en un procesador comercial de microondas para tejidos (H2500 o H2800, Energy Beam Sciences) durante 15 min. en un vaso de precipitados de 1500 ml que contiene la primera disolución; se obtiene la agitación de la disolución burbujeando para acelerar el intercambio de disolución.

Etapa 2

10 Se incuban las muestras en una disolución de alcohol isopropílico al 55%, acetona al 25%, polietilenglicol al 10% (peso molecular promedio de 300), aceite mineral de baja viscosidad al 10%, ácido acético glacial añadido a una concentración aproximada del 0,5% del volumen total, y DMSO añadido a una concentración aproximada del 1%. Se calientan las muestras a 65°C en un procesador comercial de microondas para tejidos (H2800, Energy Beam Sciences) durante 15 min. en un vaso de precipitados de 1500 ml que contiene la disolución, que se agita burbujeando.

15 Etapa 3

20 Se incuban las muestras en una disolución de alcohol isopropílico al 55%, acetona al 25%, aceite mineral de baja viscosidad al 20%, ácido acético glacial añadido a una concentración aproximada del 0,5% del volumen total y DMSO añadido a una concentración aproximada del 1% del volumen total. Se calientan las muestras a 65°C en un procesador comercial de microondas para tejidos (H2800, Energy Beam Sciences) durante 5 minutos en un vaso de precipitados de 1500 ml que contiene la disolución, que se agita burbujeando.

Etapa 4

25 Tras la irradiación de microondas, se inicia la impregnación mediante incubación en dos baños de una disolución de cera de aceite mineral de baja viscosidad al 30% y de parafina fundida al 70% colocada en un desecador grande que está apoyado en un baño de glicerina a 60°C, a un vacío de aproximadamente 640 mm de Hg, durante 5 min. en cada baño.

30 Etapa 5

35 Se completa la impregnación mediante incubación en cuatro baños de parafina fundida colocados dentro de un desecador grande que está apoyado en un baño de glicerina a aproximadamente de 75°C a 80°C y una presión reducida de aproximadamente 640 mm de Hg, durante 5 min. cada uno. Se transfirieron las secciones de tejido desde un baño de parafina hasta el siguiente en intervalos de 5 min., durante un tiempo total de impregnación de 20 min. Se midió cada intervalo de 5 min. para el tiempo en el que la lectura de presión es de aproximadamente 640 mm de Hg.

Ejemplo 2 de referencia

40 *Detección de antígeno en secciones de tejido*

45 Se cortan secciones de parafina en un micrótomo hasta un espesor de 3 micrómetros, se colocan en un baño de agua y se hacen flotar sobre un portaobjetos de vidrio. Se fundió la parafina colocando los portaobjetos o bien en un horno a 58°C durante 30 minutos o bien preferiblemente en un horno a 37°C durante aproximadamente 18 horas o durante la noche, y entonces se les eliminó la cera en un baño de xileno durante 10 minutos. Se volvieron a hidratar los portaobjetos en disoluciones de etanol decrecientes durante 1 min. cada una (dos baños de absoluto, dos baños al 95% y un baño al 90%) y se enjuagaron sumergiéndolos en agua corriente durante 2 minutos.

50 Se bloqueó la peroxidasa endógena con una disolución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 6% y metanol, o 35 ml de H_2O_2 al 6% con 140 ml de metanol, se incubó durante 15 min. Se enjuagaron los portaobjetos sumergiéndolos en agua corriente durante 2 min. y en PBS durante 2 min., después se secaron.

55 Se transfirieron los portaobjetos a una cámara de humedad y se añadió suero de caballo normal (NHS) para bloquear durante 10 min. Se decantó el suero de caballo normal en exceso del portaobjetos y se incubó un anticuerpo primario específico durante 30 min. sobre la sección de tejido en una cámara de humedad a temperatura ambiente. Se lavaron los portaobjetos con PBS con movimiento hacia atrás y hacia adelante usando un frasco lavador, se sumergieron en un baño de PBS durante 2 min., y se eliminó por secado el PBS en exceso de cada portaobjeto. Se añadió disolución de unión (también conocida como anticuerpo secundario o anticuerpo anti-ratón o anti-conejo biotinilado) a cada sección de tejido y se incubó durante 25 min. en una cámara de humedad. Se lavaron los portaobjetos con PBS usando un frasco lavador, se sumergieron en un baño de PBS durante 2 min., y se eliminó por secado el PBS en exceso de cada portaobjeto.

65 Se desarrolló la señal según las instrucciones del fabricante (Vector Laboratories). Se añadió una disolución de ABC a la sección de tejido y se incubó durante 25 min. en una cámara de humedad. Se lavaron los portaobjetos con PBS en un frasco lavador y sumergieron en una rejilla en un baño de PBS durante 2 min. Se sumergió la rejilla en un baño de cromógeno DAB durante 6 min., después se sumergió bajo agua corriente para lavar cuidadosamente durante 4 min. Se contratiñeron las secciones de tejido con hematoxilina (el tiempo de tinción dependerá de la antigüedad de la hematoxilina) durante desde 15 s hasta 90 s. Se lavaron los portaobjetos bajo agua corriente durante 3 min. para

ES 2 313 752 T3

eliminar la contratinción en exceso, se deshidrataron en baños de alcohol (durante aproximadamente 10 s en cada uno) desde el 85% hasta el 100%, se limpian en xileno y se cubrieron con cubreobjetos.

Se ha demostrado una mejor reactividad antigenica para el receptor de progesterona, antigeno relacionado con el factor VIII, CD-31, CD-68, citoqueratina-7, cromogranina y antigeno de músculo liso, probablemente debido a la mejor conservación del antigeno.

	Reactivos	Nº de catalogo	Fuente
10	Portaobjetos para microscopio - snow coat X-TRA	00206	Surgipath
15	Kit Elite ABC (patrón)	PK-6100	Vector Labs.
20	IgG anti-ratón biotinilada (H&L)	BA-2000	Vector Labs.
25	IgM anti-ratón biotinilada (H&L)	BA-2020	Vector Labs.
30	IgG anti-conejo / anti-ratón biotinilada (H&L)	BA-6000	Vector Labs.
35	Suero de caballo normal (NHS)	S-2000	Vector Labs.
40	Tetraclorhidrato de diaminobencidina	K3466	DAKO Corp.
45	Fosfato de potasio (monobásico)	7100-500 NY	Baxter Scientific
50	Fosfato de sodio (dibásico)	7917-2,5 NY	Baxter Scientific
55	Cloruro de sodio (cristales RA)	7581-2,5 NY	Baxter Scientific
60	Peróxido de hidrógeno al 30%	5240-500 NY	Baxter Scientific
65	Xileno	8644-20 NY	Baxter Scientific
	Hematoxilina de Harris	S-7735-3	Baxter Scientific
	Alcohol metílico	3016-20 NY	Baxter Scientific
	Alcohol al 95%		Florida Distillers
	Alcohol etílico absoluto		Florida Distillers

ES 2 313 752 T3

Anticuerpos, diluciones y tiempos de incubación

5	Conejo (R)	Microondas (M)	Incubación de 30'
10	Ratón (MigG)	Tripsina (T)	Incubación de 45'
15	Ratón (MigM)	Proteasa (P)	Incubación de 90'
20	Cabra (G)	Verde rápido (FG, <i>Fast Green</i>)	

	Abrev.	Anticuerpo	Procedimiento especial	Tiempo de incub.	Disol. de unión
25	(ACTH)	Hormona adrenocorticotropina	1: 2000	30'	R
30	(AACT)	Alfa-1-antiquimotripsina	1: 50000	30'	R
35	(AAT)	Alfa-1-antitripsina	1: 2000	30'	R
40	(ADENO)	Adenovirus	1: 1000	30'	MIgG
45	(AFP)	Alfa-fetoproteína	1: 2500	30'	R
50	(AEI/3)	Citoqueratina	1: 200 (M)	45'	MIgG
55	(ALA)	Alfa-lactoalbumina	1: 600	30'	R
60	(ACTIN)	Actina del músculo	1: 200	30'	MIgG
65	(APP-A4)	Anti-proteína A4 precursora de Alzheimer	1: 500 (M)	45'	MIgG
	(ASPE)	<i>Aspergillus</i>	1: 500	30'	R
	(AR)	Receptor de andrógenos	1: 20 (M) (FG)	45'	MIgG
	(BCA)	Células B	1: 200	30'	MIgG
	(bcl-2)	Anti-oncoproteína humana	1: 100 (M)	45'	MIgG
	(BerEp4)	Antígeno epitelial humano	1: 25	30'	MIgG
	(B72,3)	Glicoproteína 72 asociada a tumor TAG72	1: 100	30'	MIgG
	(BLA36)	Antígeno de linfocito B	1: 100	30'	MIgG
	(CMV)	Citomegalovirus	1: 50 (P)	30'	MIgG
	(CHRG)	Cromogranina	1: 50	30'	MIgG
	(CALC)	Calcitonina	1: 2000	30'	R
	(CEA)	Antígeno carcinoembrionario	1: 6000	30'	R
	(CERb'B2)	Oncogén Mab 1 de c-erbB-2	1: 1500	90'	R

ES 2 313 752 T3

Anticuerpos, diluciones y tiempos de incubación

	Abrev.	Anticuerpo	Procedimiento especial	Tiempo de incub.	Disol. de unión
5					
10	(CATH)	Catepsina D	1: 2000 (M)	45'	R
	(CAM 5,2)	Citoqueratina	1: 500 (M)	45'	R
	(CK 7)	Citoqueratina	1: 200 (M)	45'	MIgG
15	(CK 20)	Citoqueratina	1: 25 (M)	45'	MIgG
	(COLL IV)	Colágeno IV	1: 25 (P)	30'	MIgG
	(CA 125)	Anti-CA 125 humano (MII)	1: 20 (M)	45'	MIgG
20	(CD 30)	Anti-antígeno Ki-1 humano (BER-H2)	1: 200 (M)	45'	MIgG
25	(ER)	Receptor de estrógenos	1: 50 (M) (FG)	45'	MIgM
30	(FVIII)	Factor de Von Willebrand	1: 50 (P)	30'	MIgM
	(FSH)	Hormona estimulante del folículo	1: 3000	30'	R
35	(5 HT)	Serotonina	1: 50	30'	MIgM
	(FXIII)	Anti-factor de coagulación	1: 1200	30'	R
40	(GAST)	Gastrina	1: 2000	30'	MIgM
	(GFAP)	Proteína ácida fibrilar de la glía	1: 1500	30'	R
45	(GLUC)	Glucagón	1: 10000	30'	R
	(GH)	Hormona del crecimiento	1: 5000	30'	R
50	(GCDFP)	Proteína fluida de enfermedad quística macroscópica	1: 250	30'	MIgM
55					

ES 2 313 752 T3

	(GRP)	Péptido de liberación de gastrina	1: 1000	30'	R
5	(HMWK)	Queratina de alto peso molecular (34 β E12)	1: 10	45'	MIgM
10	(Hbcore)	Antígeno del núcleo de la hepatitis B	1: 5000	30'	R
15	(HBsAg)	Antígeno de superficie de la hepatitis B	1: 100	30'	MIgM
20	(HSV I)	Herpes Simple Tipo I	1: 10	30'	R
25	(HSV II)	Herpes Simple Tipo II	1: 10	30'	R
30	(HCG)	Gonadotropina coriónica humana	1: 50000	30'	R
	(HPL)	Lactógeno de placenta humana	1: 100000	30'	R
35	(HIST)	Histoplasma	1: 1000	30'	R
	(H. Pyl)	<i>Helicobacter pylori</i>	1: 500 (M)	45'	R
	(β -HCG)	Gonadotropina coriónica humana beta	1: 10000	30'	R
40	(IgA)	Cadena pesada alfa	1: 400	30'	R
	(IgG)	Cadena pesada gamma	1: 1000	30'	R
45	(IgAs)	Pieza secretora de IgA	1: 200	30'	R
	(IgM)	Cadena pesada Mu de IgM	1: 1000	30'	R
50	(INS)	Insulina	1: 100	30'	R
55	(Ki-67)	Antígeno nuclear MIB-1	1: 50 (M) (FG)	45'	MIgG
	(K)	Cadena ligera de kappa	1: 200 (M)	45'	MIgG
60	(KERATIN)	AEI/ 3 CAM	1: 50/1: 500 (M)	45'	MIgG
65	(LCA)	Antígeno común de leucocito	1: 50	30'	MIgG

ES 2 313 752 T3

	(Leu M1)	Antígeno Leu M1	1: 200 (M)	45'	MIgM
5	(Leu 7)	Antígeno Leu 7	1: 50 (M)	45'	MIgM
	(Lectin)	Lectina	1: 4000	USE DE	INSTEAD NHS
10	(Anti-Lectin)	Antígeno anti-lectina	1: 10000	30'	G
	(LEA 135)	Anti-antígeno epitelial luminar humano	1: 50	30'	MIgG
15					
20	(LH)	Hormona luteinizante	1: 3000	30'	R
	(L)	Cadena ligera lambda	1: 6000 (M)	45'	MIgG
	(LMK-8)	Queratina de bajo peso molecular	1: 25 (M)	45'	MIgG
25	(LIP-AS 105)	Lipasa	1: 400	30'	MIgG
30	(MCA)	Antígeno histiocítico mieloide (MAC 387)	1: 400 (M)	45'	MIgG
35	(MUR)	Muramidasa	1:2000	30'	R
	(MYOGL)	Mioglobina	1:5000	30'	R
	(MAPH)	Macrófago	1:50	30'	MIgG
40	(MTLT)	Metalotioneína	1:50	30'	MigG
	(MEL)	Melanoma HMB 45	1:50	30'	MigG
	(MAK 6)	Anti-Citoqueratina	1:50 (T)	90'	MigG
	(MBP)	Mielina	1:500	30'	R
45	(MESO)	Antígeno mesotelial	1:500	30'	MigM
	(MAST-C)	Mastocito	1:2000 (T)	30'	MigG
	(MPO)	Mieloperoxidasa	1:5000	30'	R
50	(MGN)	Miogenina	1:15	45'	MigG
	(NB)	Neuroblastoma	1:200	90'	MigG
	(N-FIL)	N-Filamento (2F11)	1:250	30'	MigG
55	(NSE)	Enolasa específica de neurona	1:4000 (M)	45'	MigG
	(PAMYL)	Amilasa pancreática	1:20	30'	MigG
60	(PCP)	<i>Pneumocystis carinii</i>	1:25	30'	MigM
	(PLAP)	Fosfatasa alcalina de placenta	1:800	30'	R

ES 2 313 752 T3

	(PPP)	Polipéptido pancreático	1:3000	30'	R	
5	(PTH)	Hormona paratiroidea	1:250 (M)	45'	(RAT)	
	(PROL)	Prolactina	1:500	30'	R	
10	(PAPH)	Fosfatasa ácida prostática	1:4000	30'	R	
	(PML) (SV40)	Leucoencefalopatía multifocal progresiva	1:10000	30'	R	
15	(PR)	Receptor de progesterona	1:100 (M)	45'	R	
20	(PR 1A6)	Receptor de progesterona	1:50 (M)	45'	MigG	
	(PSA)	Antígeno prostático específico	1:750	30'	R	
25	(PCNA)	Antígeno nuclear de proliferación celular	1:100 (M) (FG)	45'	MigG	
	(PS2)	Proteína PS2	1:1000	45'	R	
30	(P53)	Antígeno p53	1:50 (M) (FG)	45'	MigG	
35	(S 100 A)	Proteína S 100 A	1:3000	30'	R	
	(S100)	Proteína S 100	1:2000	30'	R	
40	(SOMAT)	Somatostatina	1:3000	30'	R	
	(SYNAP)	Sinaptofisina	1:800 (M)	45'	R	
	(SMA)	Actina del músculo liso	1:100	30'	MigG	
45	(αSR-1)	Actina sarcomérica	1:100	30'	MigG	
	(TESTOS)	Testosterona	1:250	30'	R	
50	(TGB)	Tiroglobulina	1:20000	30'	R	
	(TP-103)	Treponema	1:50 (T)	30'	MigG	
	(TM)	Trombomodulina	1:50	30'	MigG	
55	(TSH)	Hormona estimuladora de tiroides	1:2000	30'	R	
	(TCA)	Antígeno de células T	1:800 (M)	45'	MigG	
60	(TOXO)	Toxoplasma	1:1000	30'	R	
	(UBT)	Ubiquitina	1:250	30'	R	

ES 2 313 752 T3

	(VIP)	Péptido intestinal vasoactivo	1:1500	30'	R
5	(VIM)	Vimentina	1:800 (M)	45'	MigG
10	(VVZ)	Virus de varicela-zóster	1:100	30'	MigG
15	(WSKER)	Queratina de amplio espectro	1:500	30'	R

Ejemplo 3

Extracción de ADN a partir de secciones de tejido tratadas

20 Se colocaron dos secciones de tejido de seis micrómetros en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, se añadieron 800 μ l de xileno y se mezclaron mediante agitación con vórtex, se añadieron 400 μ l de etanol absoluto y se mezclaron mediante agitación con vórtex, se centrifugó el tubo durante 5 minutos en una microcentrifuga de alta velocidad y se decantó el sobrenadante. Al sedimento, se le añadieron 800 μ l de etanol absoluto y se mezclaron mediante agitación con vórtex.

25 Se decantó el sobrenadante tras la centrifugación tal como anteriormente y se añadieron 100 μ l de una disolución de proteinasa K/detergente (NP40 al 1% o Triton X-100, 2,4 μ l de proteinasa K 2,5 mg/ml) al sedimento y se incubó a 55°C durante una hora. Se inactivó la proteinasa K mediante incubación a 95°C durante 10 min. Se conserva el sobrenadante que contiene ADN tras la centrifugación en la microcentrifuga durante 5 min. Este material está listo para PCR. Debe precipitarse y extraerse adicionalmente si se planea una transferencia de tipo Southern. Se requerirán más secciones para obtener ADN suficiente para los análisis de restricción.

30 La figura 13A muestra que la cantidad y calidad del ADN amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son comparables entre muestras preparadas según la presente invención (ejemplo 1) y mediante tratamiento convencional de tejidos (Tissue-Tek VIP histoprocessor, Miles-Sakura, usado según las instrucciones del fabricante).

Ejemplo 4

Extracción de ARN a partir de secciones de tejido tratadas

40 Se cortaron diez secciones (de 7 μ m cada una) de un bloque de parafina usando cuchillas desechables; se prepararon los bloques según la presente invención y mediante tratamiento convencional de tejidos tal como se describe en el ejemplo 5. Se colocaron en tubos Falcon de 50 ml, se desparafinaron con 20 ml de xileno y el tejido restante se lavó entonces dos veces con alcohol absoluto durante 30 minutos. Se suspendió el tejido a 0,5 g/ml en una disolución que contenía tiocianato de guanidinio 4 M, citrato de Na 25 mM pH 7,0, N-laurilsarcosina al 0,5%, y 0,1 M de 2-mercaptoetanol. Se mezcló la disolución mediante agitación con vórtex y se fragmentó el ADN mediante pase a través de una aguja de jeringa de calibre 18 a 22.

50 Se puso cuidadosamente la disolución que contenía ARN en 2,8 ml de CsCl 5,7 M en varios tubos de centrífuga de 5 ml (Sorvall), y se sedimentó el ARN mediante centrifugación en un rotor SW55Ti a 35.000 rpm y 18°C durante 14 horas en una ultracentrifugadora Beckman L8-53. Se eliminó cuidadosamente la fracción superior para dejar un sedimento de ARN en el fondo del tubo. Se resuspendió el sedimento con agua libre de ribonucleasa, y se centrifugó el tubo Eppendorf a 14.000 rpm durante 10 min. Se conservó el sobrenadante que contenía ARN y se midió la absorbancia de UV: coeficiente de extinción 1 DO₂₆₀/cm es 40 μ g/ml de ARN, la razón DO₂₆₀/DO₂₈₀ debe estar entre aproximadamente 1,8 y aproximadamente 2,0. Se extrajo un total de 45 μ g de ARN a partir de muestras de tejido preparadas según la presente invención mientras que no pudo detectarse ARN a partir de muestras de tejido tratadas de manera convencional (figura 13B).

60 Aunque la presente invención se ha descrito en relación con lo que se considera actualmente que son realizaciones preferidas y prácticas, se entiende que la presente invención no ha de limitarse ni restringirse a las realizaciones dadas a conocer pero, por el contrario, se pretende cubrir diversas modificaciones y disposiciones equivalentes incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

65 Por tanto, ha de entenderse que variaciones en la invención descrita serán obvias para los expertos en la técnica sin apartarse de los aspectos novedosos de la presente invención y se pretende incluir tales variaciones dentro del alcance de las reivindicaciones a continuación.

ES 2 313 752 T3

REIVINDICACIONES

1. Método para el tratamiento continuo de tejidos que comprende

- (a) proporcionar una muestra de tejido de hasta 3 mm de espesor;
- (b) fijar, deshidratar y eliminar la grasa de dicha muestra de tejido con energía de microondas y disoluciones no acuosas, siendo al menos una disolución no acuosa una primera disolución compuesta por un alcohol y una cetona en una razón en volumen de alcohol con respecto a cetona entre 1 y 3;
- (c) impregnar dicha muestra de tejido fijada, deshidratada y desgrasada en presión inferior a la atmosférica mediante una disolución de cera compuesta por parafina;
- (d) repetir las etapas (a) a (c) con al menos otra muestra de tejido;

mediante lo cual se tratan de manera continua muestras de tejido iniciando la etapa (a) para una muestra de tejido tratada posteriormente antes que la etapa (c) se haya completado para una muestra de tejido tratada anteriormente de modo que se trata una muestra de tejido desde la fijación hasta la impregnación en menos de dos horas.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de tejido se corta hasta un espesor de entre 1 mm y 2 mm, antes del tratamiento.

3. Método según la reivindicación 2, en el que dicha muestra de tejido se corta hasta un espesor de aproximadamente 1,5 mm antes del tratamiento.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además seccionar dicha muestra de tejido fijada, deshidratada, desgrasada e impregnada para proporcionar una sección de tejido de entre 1 micrómetro y 50 micrómetros.

5. Método según cualquiera de la reivindicación 1 a 4, en el que dicha muestra de tejido se incuba en dicha primera disolución durante menos de 25 minutos.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha primera disolución está compuesta además por polímeros de peso molecular promedio entre 100 y 500.

7. Método según la reivindicación 6, en el que dicha primera disolución está compuesta por acetona, alcohol isopropílico y polietilenglicol.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además aclarar dicha muestra de tejido en una disolución no acuosa compuesta por agente de aclarado.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se tratan muestras de tejido sin usar formalina.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se tratan muestras de tejido sin usar xileno.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha muestra de tejido fijada, deshidratada y desgrasada se impregna con ceras de diferentes puntos de fusión.

12. Método según la reivindicación 11, en el que dicha muestra de tejido fijada, deshidratada y desgrasada se impregna con una disolución de cera compuesta por aceite mineral y parafina.

13. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de tejido fijada, deshidratada y desgrasada se impregna en parafina fundida durante menos de 15 minutos.

14. Método según la reivindicación 1, que comprende además colocar dicha sección de tejido sobre un portaobjetos para histología y entonces eliminar la cera del portaobjetos.

FIG. 1
LA PRÁCTICA DE LA HISTOPATOLOGÍA QUIRÚRGICA
Ruta convencional desde la cirugía hasta el diagnóstico de tejidos

DÍA 1

"descripción clasificación por lotes de las
Cirugia →macroscópica"→ las muestras → entrada de las
muestras clasificadas por lotes → tratamiento durante la noche
en el procesador

DÍA 2

Salida de las muestras clasificadas por lotes del procesador →bloqueo→
microtomia → tinción con → diagnóstico
H y E

**INTERVALO DE TIEMPO DESDE LA CIRUGÍA
HASTA EL DIAGNÓSTICO: > 22 HORAS**

FIG. 2

LEYENDA DEL EQUIPO

- | | |
|-----|--|
| (A) | BOMBA DE VACÍO |
| (B) | BAÑO DE AGUA |
| (C) | HORNO MICROONDAS |
| (D) | HORNO MICROONDAS |
| (E) | HORNO MICROONDAS |
| (F) | BOMBA DE VACÍO |
| (G) | BAÑO DE AGUA |
| (H) | CAMPANA EXTRACTORA DE LA MESA DE TRABAJO (PEQUEÑA) |
| (I) | INSTRUMENTO DE INCRUSTACIÓN |
| (J) | BAÑO DE PARAFINA |
| (K) | HORNO DE PORTAOBJETOS |
| (L) | MICRÓTOMO |
| (M) | BAÑO DE AGUA |
| (N) | PLACA CALIENTE |
| (O) | INSTRUMENTO DE TINCIÓN |
| (P) | INSTRUMENTO DE INMUNOTINCIÓN (IHC) |
| (Q) | CONTROLES DE IHC |
| (R) | CUBREOBJETOS |

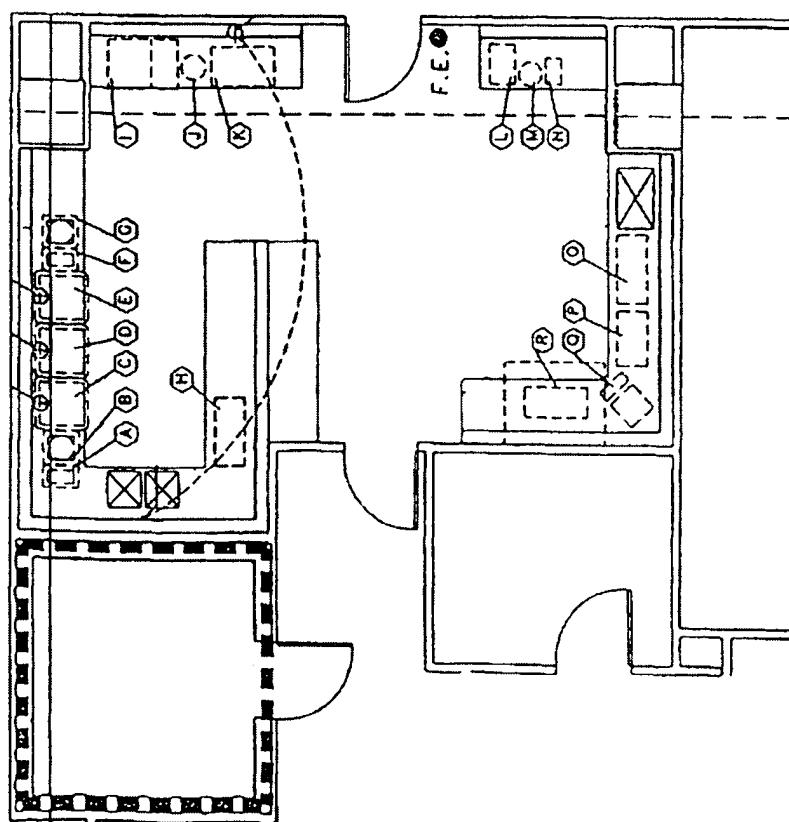


FIG. 3

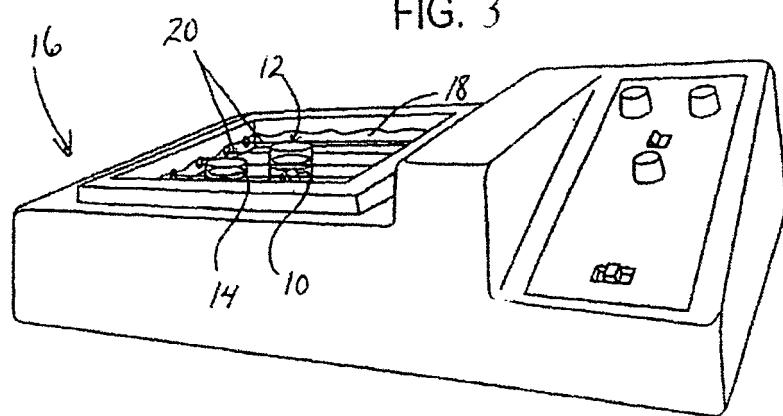


FIG. 4

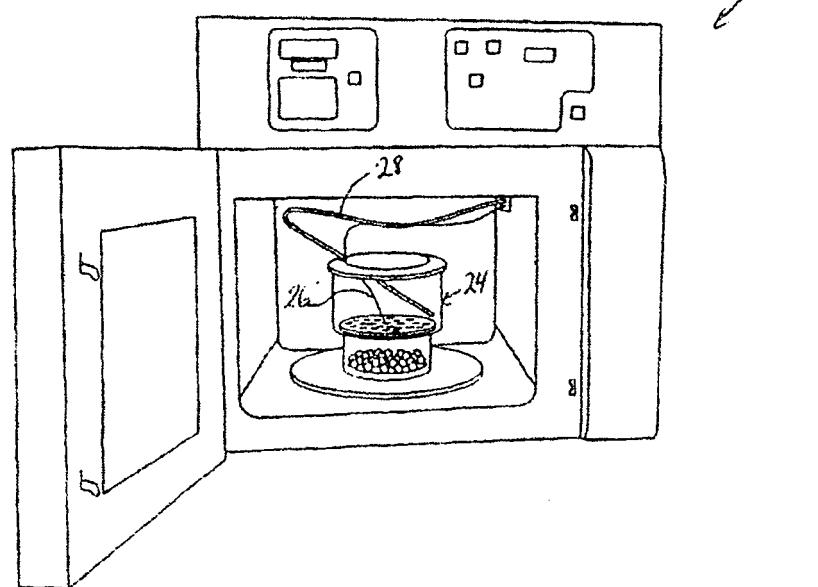


FIG. 6

↙ 42

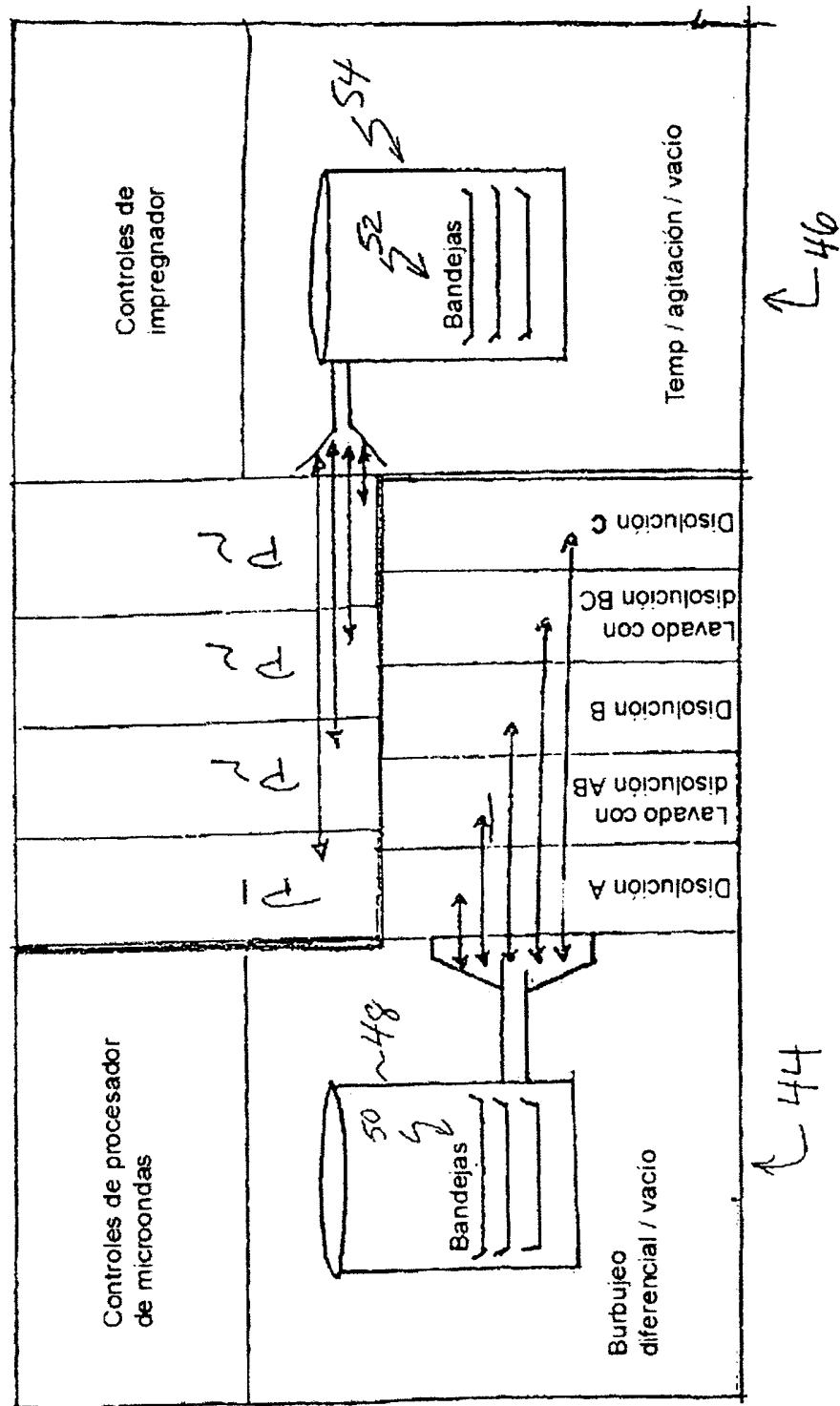


FIG. 5

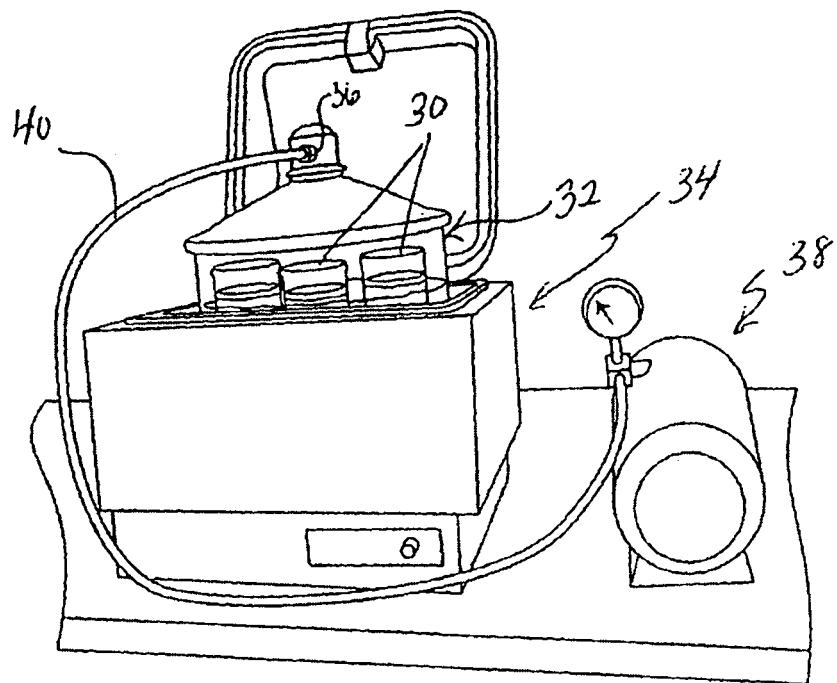


FIG. 7

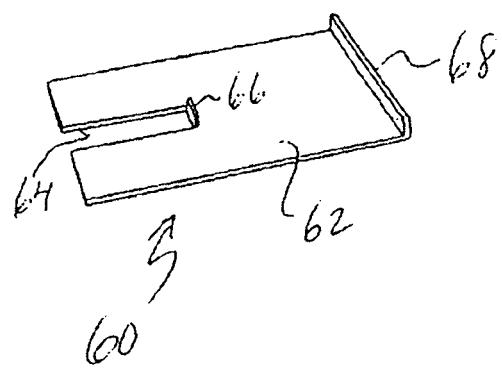
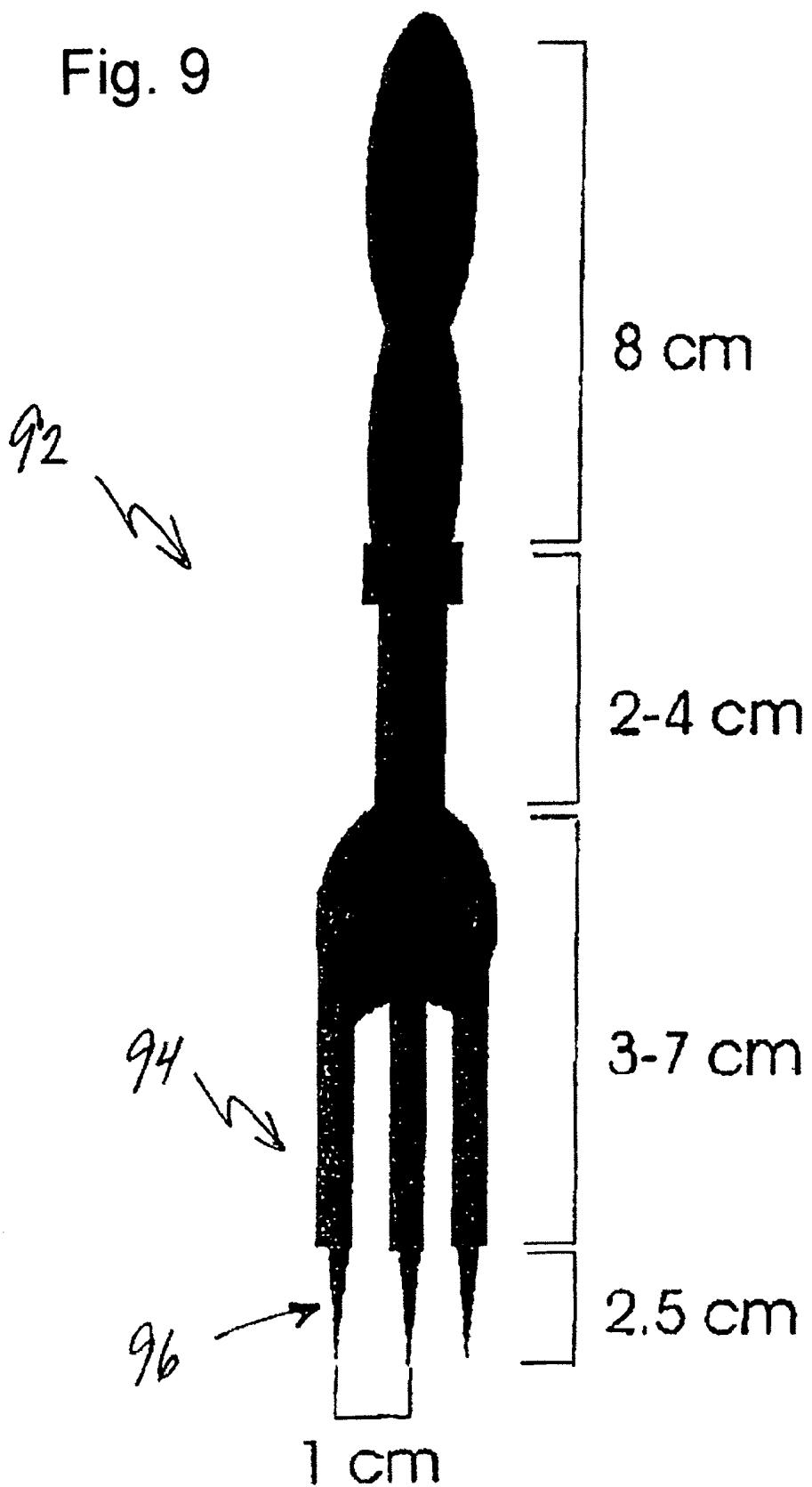


Fig. 9



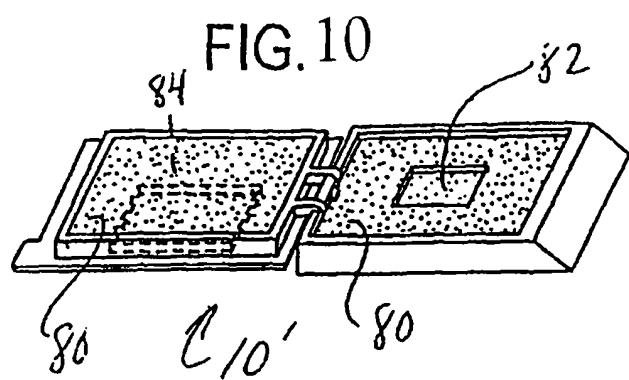


FIG. 11

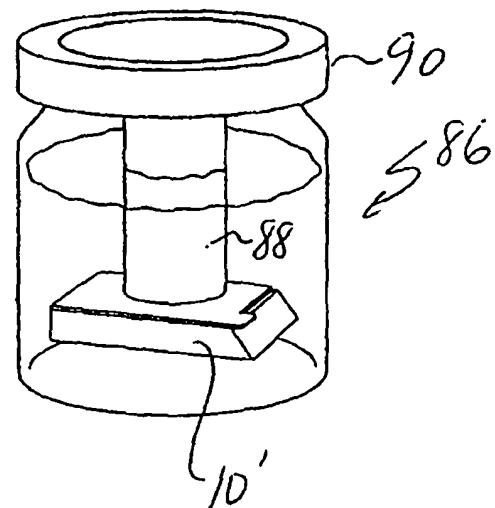
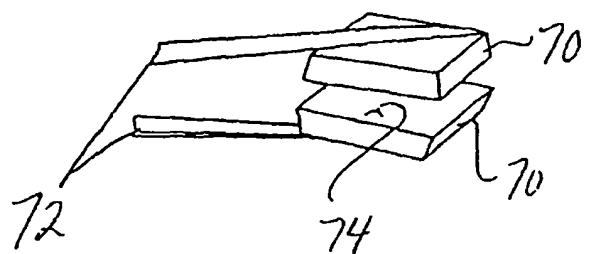


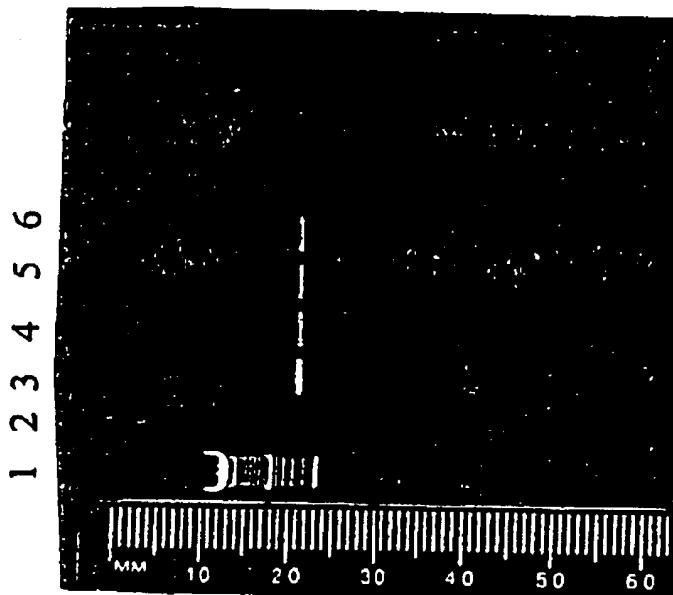
FIG. 8



ES 2 313 752 T3

FIG. 12

A



B

