

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2018-207

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02.05.2018**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.12.2019**
(Věstník č. 50/2019)

- (71) Přihlašovatel:
GeneProof a.s., Brno, Dolní Heršpice, CZ
- (72) Původce:
RNDr. Miloš Dendis, Jedovnice, CZ
RNDr. Radek Horváth, Ph.D., Brno, Židenice, CZ
Bc. Martin Petřík, Velké Popovice, CZ
Mgr. Bc. Tomáš Starý, Pelhřimov, CZ
Mgr. Zdeněk Přidal, Olomouc, Lazce, CZ
Petr Knopf, Šternberk, CZ
Ing. Marek Švarc, Výkleky, CZ
- (74) Zástupce:
PatentEnter s.r.o., Koliště 1965/13a, 602 00 Brno,
Černá Pole

- (54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob plynotěsného uzavírání jamek v
PCR destičkách a automatický uzavírač
PCR destiček**

- (57) Anotace:
Způsob plynotěsného uzavírání jamek v PCR destičkách pro automatický diagnostický PCR proces, při kterém je PCR destička plynotěsně uzavřena pomocí těsnicí fólie, která je přenesena a přitlačena na PCR destičku, kde podstata spočívá v tom, že je nejprve před započítím diagnostického PCR procesu v analyzátoru na tělo automatického uzavírače PCR destiček umístěna a k tělu automatického uzavírače PCR destiček přichycena těsnicí fólie, a automatický uzavírač PCR destiček je ustaven do své parkovací polohy tak, aby nepřekážel, dále je v průběhu diagnostického PCR procesu po naplnění jamek PCR destičky chemikáliemi automatický uzavírač PCR destiček naveden polohovacím zařízením do pozice pro plynotěsné uzavírání a provedeno plynotěsné uzavírání těsnicí fólií, při kterém je tato těsnicí fólie přitlačena a přenesena z těla automatického uzavírače PCR destiček opatřeného těsnicí fólií na

PCR destičku tlakem a kolíbatým valivým pohybem těla automatického uzavírače PCR destiček, přičemž po utěsnění těsnicí fólií je automatický uzavírač PCR destiček naveden zpět do parkovací polohy. Dalším předmětem vynálezu je automatický uzavírač PCR destiček pro provedení uvedeného způsobu, který obsahuje závěs a tělo automatického uzavírače PCR destiček ve tvaru podélně vyseknutého válce obsahující válcovou plochu pláště a výsekovou plochu pláště, kde tělo automatického uzavírače PCR destiček je spojené se závěsem otočně spojem s osou otáčení shodnou se středovou osou válcové plochy a závěs je dále spojen posuvně s polohovacím zařízením; automatický uzavírač PCR destiček dále obsahuje alespoň jeden upínací prvek pro přichycení obou konců těsnicí fólie k tělu automatického uzavírače PCR destiček.

Způsob plynotěsného uzavírání jamek v PCR destičkách a automatický uzavírač PCR destiček

5 Oblast techniky

Vynález se týká analyzátorů pro automatický diagnostický PCR proces, konkrétně automatizovaného procesu utěšňování jamek v PCR destičkách.

10

Dosavadní stav techniky

Analýza PCR (Polymerase Chain Reaction), která je založená na amplifikaci úseků nukleových kyselin polymerázovou řetězovou reakcí, je známou diagnostickou metodou pro identifikaci biologického materiálu. Součástí diagnostického PCR procesu je dávkování jednotlivých roztoků pro PCR analýzu do zkumavek často uspořádaných do PCR destičky vyráběné ve standardizovaných rozměrech. Z důvodu termických procesů během analýzy je nutné tuto PCR destičku utěsnit, což se běžně provádí pomocí k tomuto účelu vyráběné těsnicí fólie odpovídajících rozměrů. Tyto archy těsnicích fólií obdélníkového tvaru jsou na PCR destičku standardně připevňovány manuálně, nejčastěji přitlačením rukou, špachtlí nebo pomocí ručního válečku. Během následující analýzy překrývá PCR destičku s těsnicí fólií ještě přitlačné víko, které však nemá utěšňující funkci a obvykle plní funkci horního ohřevu tak, aby byl roztok ohříván rovnoměrně, tedy nejen zdola, čímž je zabráněno kondenzaci roztoku v horní části PCR destičky či na povrchu těsnicí fólie. Diagnostický PCR proces se sestává ze sledu navazujících dějů a úkonů trvajících několik hodin, přibližně 2 až 4 hodiny. V prvním kroku jsou z klinického materiálu izolovány nukleové kyseliny, ve druhém kroku je proveden tzv. PCR setup – příprava vlastních PCR reakcí v PCR destičce a přidání vzorků do konkrétních pozic v PCR destičce a ve třetím kroku probíhá vlastní PCR reakce, přičemž úkon manuálního utěšňování těsnicí fólie na PCR destičku je prováděn přibližně po 1 až 2 hodinách diagnostického PCR procesu, konkrétně až po prvních dvou krocích před zahájením vlastní PCR reakce. Problémem manuálního utěšňování v laboratorních analyzátoch je, že je po nadávkování roztoků do PCR destičky nutné proces přerušit, analyzátor pro automatizovaný diagnostický PCR proces otevřít, případně PCR destičku vysunout/vytáhnout a opatřit těsnicí fólií utěsněním například rukou laboranta. Následně je PCR destička opatřená těsnicí fólií vložena/zasunuta zpět do analyzátoru, analyzátor uzavřen a pokračuje dalšími automatickými kroky analýzy. Takový postup je nevýhodný, protože díky tomuto jedinému manuálnímu zásahu do jinak plně automatizovaného procesu není možné analyzátor opustit na celou dobu analýzy, je nutné hlídat vhodnou dobu pro upevnění těsnicí fólie na PCR destičku, zároveň roste pravděpodobnost chyby způsobené lidským faktorem, jednak možného špatného připevnění těsnicí fólie, kontaminace roztoků či jejich rozlití, a také nemusí dojít k včasnému provedení tohoto manuálního úkonu. Celý proces se tak stává pouze poloautomatickým.

Těsnicí fólie speciálně vyráběná pro účely chemických analýz je komerčně dodávána buď ve velkých rolích pro rozsáhlejší průmyslové různé analytické stroje, nebo, jak je tomu například v případě PCR analýz, přímo v obdélníkových arších standardních rozměrů odpovídajících běžným rozměrům PCR destiček, kde archy mají tvar obdélníku s delšími bočními stranami a dále s kratšími stranami obdélníku tvořícími první a druhý konec těsnicí fólie. Tyto komerčně vyráběné archy mohou být opatřeny podobně jako samolepky krycí/nosnou vrstvou, kterou je potřeba před použitím manuálně odstranit.

50

Ve velkoobjemovém měřítku průmyslově prováděných jiných, než PCR analýz je utěšňování analytických destiček plně automatizováno za využití rolí s navinutou těsnicí fólií. Na trhu jsou k dispozici laboratorní (bench top) automatické anebo poloautomatické utěšňovače analytických destiček, které pracují s těsnicí fólií namotanou v zásobníku pro opakované použití, mohou používat i funkci tepelného zatavování a svou konstrukcí nejsou vhodné pro umístění do

55

automatického diagnostického procesu pro PCR analýzy anebo do přístrojů pro manipulaci s tekutými vzorky. Neumožňují utěšňování PCR destiček přímo v menších automatizovaných celcích. Do menších laboratorních analyzátorů pro automatický diagnostický PCR proces není tedy možné tyto velké průmyslově vyráběné kotouče těsnících fólií začlenit a úprava analyzátoru pro použití těchto rolí by nutně vedla k prostorovému zvětšení analyzátoru či nákladnému přizpůsobování jednak standartních rozměrů těchto rolí menším laboratorním analyzátorům, a především k nutnému vývoji odvíjecího a přitlačného zařízení instalovaného do konstrukce analyzátoru, přičemž by bylo nutné také řešit řadu dalších souvisejících problémů. Takové laboratorní zařízení zatím z uvedených důvodů nebylo zkonstruováno.

V patentovém dokumentu US 2008115885 je použita manuálně ovládaná žehlička k tepelnému utěsnění těsnícího média k vzorkovací destičce.

V patentovém dokumentu US 2012196774 je popsáno obecné řešení utěšňování pomocí pevných materiálů s modifikovaným povrchem, například fólií z vhodného pevného materiálu, adheziva citlivého na tlak, přitlačovaným k utěšňovanému povrchu pomocí tlaku, například pomocí pohyblivé plošiny, rolovacího pásu, válce.

Na trhu je také znám automatický uzavírač PCR destiček neboli sealovač („Plate sealer“), sloužící k plynotěsnému uzavření jamek PCR destiček nebo jiných analytických destiček těsnící fólií připevňovaných k utěšňovanému povrchu pomocí tlaku, například pomocí pohyblivé plošiny, rolovacího pásu, válce apod. Tento automatický uzavírač PCR destiček je vhodný do systémů pro manipulaci s tekutými vzorky a eventuálně vhodný pro použití v automatických diagnostických procesech. Analytická mikrotitrační destička je nejprve vložena do automatického uzavírače PCR destiček mimo analytický přístroj nebo uzavřena ručně a po utěsnění těsnící fólie například pomocí role nebo žehličky s termickým sealováním, vyjmuta a přenesena na cílovou pozici do přístroje pro analýzu. Tento automatický uzavírač PCR destiček není možné implementovat do analyzátoru pro automatický diagnostický PCR proces, respektive by to bylo nákladné.

Alternativním řešením je použití horní přitlačné desky v tzv. bench top automatických uzavíračích PCR destiček, která je často temperovatelná pro účely uzavírání destiček termofóliemi. Temperaci však může docházet k znehodnocení obsahu destiček, proto teplota musí být optimalizována tak, aby nedošlo ke znehodnocení obsahu destičky, a přitom byla dostatečná pro utěsnění těsnící fólie.

V patentovém dokumentu US 6917035 je zmíněno automatizované přitlačné zařízení ve formě rovinné desky pro utěšňování mikrotitračních desek pomocí typicky 0,5 až 2 mm tlusté fólie či flexibilní elasticky formovatelné gumové/silikonové nebo z termoplastického elastomeru matrace, kdy přitlačné zařízení je posuvné ve vertikálním směru.

V patentovém dokumentu US 2005074360 je popsán automatický uzavírač PCR destiček pro mikrotitrační destičky pro biologické vzorky s použitím těsnící fólie pomocí rovné tlakové hlavy, přičemž těsnící fólie může být odmotávána automatizovaně ze zásobního kotouče a navedena pomocí vodicích válců k povrchu mikrotitrační destičky, přičemž před vstupem na mikrotitrační desku dochází k oddělení nosné vrstvy těsnící fólie od samotné těsnící fólie. Následně jsou utěsněné destičky stohovány pro další použití.

V patentovém dokumentu US 6408595 je popsán samostatně stojící automatický uzavírač PCR destiček mikrotitračních destiček stojící připevněný přísavkami k pevnému povrchu, se stabilní základnou s bočními panely, mezi kterými je volně v kolejnicích uložen zásuvný panel s mikrotitrační destičkou a na ní volně položeným utěšňovacím krytem, který je zasouván v kontaktu s rotujícím válcem ovládaným manuálně pomocí automatického uzavírače PCR destiček obousměrně otočné kliky. Podobně je v patentovém dokumentu US 6543203 popsán ve formě skříňky s manuální klikou, do kterého se vkládá analytická destička s na ní umístěným

krytem, kdy v jednom směru otáčení je možné kryt analytické destičky utěsnit k analytické destičce a v opačném směru otáčení opět oddělit.

5 Patentový dokument EP 2431747 popisuje otočný utěšňovací tlakový válec pro přitlačení těsnicí fólie položené na horní povrch mikrotitrační destičky, umístěný na vstupu/výstupu prostoru pro automatizované nakládání s kapalnými vzorky, který zároveň slouží jako pohyblivý mechanismus pro vsouvání či vysouvání mikrotitrační destičky z/do uvedeného prostoru. Případně může být mikrotitrační destička posouvána a tlačena mezi dvěma takovými válci, kdy jeden z válců tlačí zespodu na procházející mikrotitrační destičku a druhý shora na těsnicí fólii.

10 Dalším alternativní způsobem je například použití lepicí aluminiové fólie, přičemž hrozí riziko kontaminace obsahu jamek destičky lepidlem.

V případě automatických diagnostických linek se problém uzavření PCR destiček řeší:

- 15
- Použitím specifických plastových zkumavek místo PCR destiček a uzavíráním pomocí vršků místo těsnicí fólie
 - Manuálním přenesením těsnicí fólie utěsněním na PCR destičce rukou. Diagnostický proces se přeruší, operátor ručně uzavře PCR destičku těsnicí fólií a přenesení ji do PCR přístroje.
 - Přenesením těsnicí fólie na PCR destičku pomocí přísavek a přitlačení v cycleru pomocí víka, kdy může dojít k nežádoucímu posunu fólie, obnažení krajních jamek, odpaření obsahu jamky a k nebezpečné kontaminaci prostředí analyzátoru.
- 20

25 V patentovém dokumentu US 20120058516 je zmíněno utěšňování analytické PCR destičky tepelným ohřevem těsnicí fólie s pomocí utěšňovacího víka a s možností automatizace.

30 V patentovém dokumentu US 8030080 je popsáno utěšňování PCR destiček flexibilní bariérou (termoplastický elastomer) nebo nahřátým víkem cycleru s flexibilním těsněním pomocí ohřevu a tlaku. Dále je využito robotického ramene nebo jiného manipulačního zařízení k uvolnění těsnicího tlaku, k vertikálnímu zdvihu víka a přenesení do pozice mimo analytickou destičku.

35 Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky řeší způsob plynotěsného uzavírání jamek v PCR destičkách automatickým uzavíračem PCR destiček pro automatický diagnostický PCR proces v analyzátoru, při kterém je alespoň z části chemikáliemi naplněná PCR destička plynotěsně uzavřena pomocí těsnicí fólie, která je přenesena a přitlačena na horní pevnou okrajovou část jamek PCR destičky, kde podstata spočívá v tom, že je nejprve před započítím diagnostického PCR procesu v analyzátoru na tělo automatického uzavírače PCR destiček umístěna a k tělu automatického uzavírače PCR destiček přichycena těsnicí fólie, a automatický uzavírač PCR destiček je ustaven do své parkovací polohy tak, aby nepřekážel, dále je v průběhu diagnostického PCR procesu po naplnění jamek PCR destičky chemikáliemi automatický uzavírač PCR destiček naveden polohovacím zařízením do pozice pro plynotěsné uzavírání a provedeno plynotěsné uzavírání těsnicí fólií, při kterém je tato těsnicí fólie přitlačena a přenesena z těla automatického uzavírače PCR destiček opatřeného těsnicí fólií na horní pevnou okrajovou část jamek PCR destičky tlakem a kolíbatým valivým pohybem těla automatického uzavírače PCR destiček, přičemž po utěsnění těsnicí fólií je automatický uzavírač PCR destiček naveden zpět do parkovací polohy. Následně je spuštěn proces polymerázové řetězové reakce, tzv. vlastní PCR analýzy.

40

45

50

55 Hlavní výhodou a řešeným problémem výše popsaného způsobu plynotěsného uzavírání PCR destiček je, že je možné jej použít do relativně malých plně automatizovaných, případně

poloautomatizovaných analyzátorů pro automatický diagnostický PCR proces, kde zautomatizování plynotěsného uzavírání PCR destiček umožňuje plnou automatizaci laboratorních či mobilních analyzátorů pro automatický diagnostický PCR proces, usnadňuje práci obsluhy, jejíž přítomnost je nyní nutná pouze před zahájením a po skončení
 5 několikahodinové analýzy, čímž je omezena chybovost zaviněná lidským faktorem a zajištěna sterilita procesu a také je nižší riziko potřísnění obsluhy chemikáliemi.

Podstatné pro automatizaci diagnostického PCR procesu je, že těsnicí fólie je připravená před
 10 započítáním analýzy na těle automatického uzavírače PCR destiček, nikoliv položena přímo na PCR destičku před analýzou nebo před tlakovým utěsňováním. Tímto je umožněn přístup do jamek pro automatické dávkování chemikálií a následně lze provést utěsňování fólií automatizovaně, aniž by bylo nutné během procesu manuálně fólii na PCR destičky pokládat.

Plynotěsným uzavřením jamek v PCR destičkách je myšleno vytvoření dostatečně pevného spoje
 15 mezi vstupním horním okrajem otvoru jamky v PCR destičce tlakovým působením na tento pevný horní okraj skrz speciálně k tomuto účelu komerčně vyráběnou nebo obdobnou těsnicí fólii, která má schopnost po vyvinutí určitého silového působení vytvořit soudržné fyzikální interakce s povrchem PCR destičky. Spoj musí být dostatečně pevný na to, aby vydržel tlak vyvinutý chemikáliemi při ohřevu. Potřeba pevnosti spoje se tedy bude například odvíjet od
 20 použitých chemikálií, teploty a doby ohřevu.

Plynotěsné, případně i kapalinotěsné uzavírání jamek v PCR destičkách je účelné teprve, až tyto nádoby obsahují chemikálie. Jde například o reagentie pro PCR analýzu, kapalně vzorky či zásobní vstupní roztoky apod., které mohou být plněny do těchto nádob například pipetováním,
 25 přičemž většinou nejsou naplněny chemikáliemi zcela, jen zčásti. Také je možné zaplnění jen některých jamek PCR destičky chemikáliemi.

Vynález byl vyvinut zejména pro standardně používané PCR destičky pro PCR automatický diagnostický PCR proces, ale lze jej použít i pro jiné analytické destičky, například mikrotitrační
 30 destičky pro analýzy a manipulaci s násobným množstvím kapalných vzorků.

Automatizovaným procesem je myšleno automatizované, případně poloautomatizované stanovení vlastností či složení kapalných vzorků v analyzátoru pro diagnostický PCR proces pomocí naprogramovaných kroků s minimalizací zásahu obsluhy, především jsou pak v analyzátoru pro
 35 automatický diagnostický PCR proces automatizovány například kroky aktivace mechanismu automatického uzavírače PCR destiček a polohování, přitlačování či další manipulace s tělem automatického uzavírače PCR destiček, jakož i ostatní operace týkající se například pipetování chemikálií, ohřev apod.

Dalším předmětem vynálezu je automatický uzavírač PCR destiček pro plynotěsné uzavírání
 40 jamek v PCR destičce pomocí těsnicí fólie, jehož podstata spočívá v tom, že automatický uzavírač PCR destiček obsahuje závěs a dále tělo automatického uzavírače PCR destiček ve tvaru podélně vyseknutého válce obsahující jednak válcovou plochu pláště pro silové přenesení těsnicí fólie na horní pevnou okrajovou část jamek PCR destičky tlakem a kolíbovým valivým pohybem
 45 těla automatického uzavírače PCR destiček a jednak výsekovou plochu pláště, kde tělo automatického uzavírače PCR destiček je spojené se závěsem otočně spojem s osou otáčení shodnou se středovou osou válcové plochy a závěs je dále spojen posuvně s polohovacím zařízením pro horizontální a/nebo vertikální posun automatického uzavírače PCR destiček v rovině kolmé na osu otáčení těla automatického uzavírače PCR destiček; automatický uzavírač
 50 PCR destiček dále obsahuje alespoň jeden upínací prvek pro přichycení obou konců těsnicí fólie k tělu automatického uzavírače PCR destiček.

Automatický uzavírač PCR destiček je zařízení, které zprostředkuje plynotěsné/parotěsné uzavření původně otevřeného prostoru jamek v PCR destičce, umístěné v samostatném stojánku

nebo přímo v analyzátoru pro automatický diagnostický PCR proces. Toto uzavření je provedeno těsnicí fólií pomocí fyzikálních přídržných sil tlakem.

5 Ve výhodném provedení zaujímá válcová plocha pláště plášť válce v rozsahu 90° až 270° úhlu kruhové podstavy, s výhodou 180° , a zbývající část do 360° je tvořen výsekovou plochou pláště. Ve výhodném provedení je tělo automatického uzavírače PCR destiček ve tvaru půlválce.

10 Výseková plocha pláště může být provedena jako klasická kruhová výseč kruhové podstavy nebo jako přímá spojnice mezi koncovými body chybějící části kružnice. Ve výhodném provedení k upínání konců těsnicí fólie slouží rovná výseková plocha pláště, kde rovná plocha zajišťuje kontakt mezi tělem automatického uzavírače PCR destiček a upínacím prvkem a umožňuje tak jednodušší konstrukci upínacího prvku.

15 Ve výhodném provedení je přichycení těsnicí fólie k půlválcovému tělu automatického uzavírače PCR destiček provedeno manuálním vložením prvního a druhého konce těsnicí fólie mezi rovnou výsekovou plochu pláště půlválcového těla automatického uzavírače PCR destiček a alespoň jeden upínací prvek s následným přitlačováním upínacího prvku k tělu automatického uzavírače PCR destiček, a plynulé uzavírání je provedeno těsnicí fólií kolíbatým valivým pohybem těla automatického uzavírače PCR destiček. Před zahájením dalšího vkládání těsnicí fólie je upínací prvek od těla automatického uzavírače PCR destiček oddělen.

25 Půlválcové tělo automatického uzavírače PCR destiček je speciálně vytvořený prvek automatického uzavírače PCR destiček, který umožňuje kolíbatý valivý pohyb, například po povrchu PCR destiček. Je vhodné, aby rozměry těla automatického uzavírače PCR destiček byly uzpůsobeny rozměrům PCR destiček tak, aby kolíbatým valivým pohybem těla automatického uzavírače PCR destiček byla pokryta celá horní plocha jamek a jejich pevných okrajových částí na PCR destičce, a tak mohla být těsnicí fólie alespoň dopředným kolíbatým pohybem celá přitlačena k PCR destičce. Prakticky záleží na vyvinuté síle, je možné nastavit těsnicí fólie tak, že bude proveden několikrát dopředný pohyb tam a zpět.

30 Jeden rozměr obdélníkového archu těsnicí fólie nemusí být přesně shodný s výškou půlválce, ale je to vhodné, druhý rozměr musí odpovídat tak, aby bylo možné přichytit těsnicí fólii na tělo automatického uzavírače PCR destiček a těsnicí fólie musí zároveň prostor na PCR destičce požadovaný k utěsnění, tj. vymezený jamkami a jejich pevnou okrajovou částí, překrýt, aby mohla být těsnicí fólie upevněna k horní pevné okrajové části jamek PCR destičky. Horní a dolní povrch těsnicí fólie jsou upraveny tak, aby dolní povrch vytvářel po vyvinutí tlaku na těsnicí fólii příslušné fyzikální interakce s PCR destičkou, a současně aby horní povrch těsnicí fólie nevytvářel příslušné interakce k tělu automatického uzavírače PCR destiček.

40 Ve výhodném provedení má válcová plocha pláště tvar obdélníku o minimálních rozměrech pokrývajících plochu vymezenou jamkami a jejich pevným okrajem na PCR destičce k utěsnění.

45 Upínací prvek může být jakýkoliv prostředek zajišťující přídržení těsnicí fólie na těle automatického uzavírače PCR destiček. Mohou to být vzájemně přitahující se magnety, kde jeden kus je implementovaný do těla automatického uzavírače PCR destiček a druhý k němu přiléhající přes těsnicí fólii nebo magnety umístěné v pouzdře, přičemž jeden z magnetických protikusů může být nahrazen feromagnetickým materiálem, ale také mohou to být různé klipy, kolíky a jiné přichytné prvky.

50 Ve výhodném provedení je upínací prvek ve formě pouzdra, kde spodní část pouzdra rozměrově a tvarově kopíruje výsekovou plochu pláště z feromagnetického materiálu a uvnitř pouzdra je ve spodní části alespoň jeden magnet, a dále je pouzdro propojeno s výsekovou plochou pláště pomocí zábrany sestávající z těla opatřené na svých koncích dvěma hlavami, kde jedna hlava zábrany je uložena v dutém těle automatického uzavírače PCR destiček a druhá hlava zábrany je uložena v pouzdře a tělo zábrany prochází otvorem ve výsekové ploše pláště a otvorem ve spodní

části pouzdra, kde každý otvor je menší než příslušná hlava, a tělo zábrany je opatřeno rozpěrnou pružinou překonávající magnetickou sílu u odděleného těla automatického uzavírače PCR destiček od pouzdra, ale nepřekonávající magnetickou sílu pouzdra stlačeného k tělu automatického uzavírače PCR destiček.

5

Ve výhodném provedení jsou v pouzdře čtyři magnety umístěné v blízkosti rohů obdélníkové spodní části pouzdra a pouzdro je s výsekovou plochou pláště propojeno pomocí čtyř zábran opatřených pružinami. Zábrana může být například provedena jako kovová tyčinka se závity v koncových částech a s kovovou maticí na každém konci, pouzdro může být například plastové.

10

Je-li pouzdro odděleno od těla automatického uzavírače PCR destiček, je díky pružině udržováno oddělené, dokud není stlačeno k tělu automatického uzavírače PCR destiček. Po stlačení drží pouzdro díky větší magnetické síle u těla automatického uzavírače PCR destiček a zároveň pokud je mezi ně předem sevřena těsnicí fólie, přidržuje tuto těsnicí fólii za její konce, dokud nedojde k přenosu a přitlačení těsnicí fólie na PCR destičku, kdy síly mezi těsnicí fólií a PCR destičkou převáží a pohybem automatického uzavírače PCR destiček dojde k vytažení konců těsnicí fólie původně přichycených magnetickou silou mezi upínací prvek a tělo automatického uzavírače PCR destiček.

20

Před zahájením dalšího vkládání těsnicí fólie je upínací prvek od výsekové plochy pláště oddělen, takto oddělený potom drží pomocí výše zmíněných zábran s pružinami.

Ve výhodném provedení obsahuje výseková plocha pláště těla automatického uzavírače PCR destiček alespoň jeden pružný pin s hrotem z materiálu vedoucího elektrický proud a napojené na přívod proudu, kdy hrot slouží pro zajištění většího tření a zamezení pohybu přichycené těsnicí fólie a přívod proudu slouží k detekci umístění těsnicí fólie. Pokud pružným pinem prochází proud, tedy pokud se pin přímo dotýká přitlačného prvku, je detekováno, že těsnicí fólie není umístěna mezi přitlačný prvek a tělo automatického uzavírače PCR destiček. Naopak, pokud neprochází pružným pinem proud, je zaznamenáno, že je těsnicí fólie správně umístěna. S výhodou jsou tyto piny čtyři. Nejlépe jsou piny umístěné v blízkosti okrajů koncových částí vložené přichycené těsnicí fólie.

Ve výhodném provedení je povrch válcové plochy pláště tvořen neadhezivním materiálem vůči hornímu povrchu těsnicí fólie, například kovem, hliníkem, nerezovou ocelí, teflonem, silikonem apod., který nevytváří při tlaku na těsnicí fólii dostatečně silné interakce/vazby s horním povrchem těsnicí fólie. Výseková plocha pláště může být v případě použití magnetického upínacího prvku tvořena feromagnetickým materiálem, například ocelí.

Přichycení těsnicí fólie k automatickému uzavírači PCR destiček může být provedeno různými způsoby, s výhodou má arch těsnicí fólie na obou svých koncích separátně provedené okrajové pásky či křídélka rovněž opatřené páskem krycí vrstvy, které není nutné manuálně odstranit a lze je použít pro uchycení těsnicí fólie k tělu automatického uzavírače PCR destiček upínacími prvky, například klipy, magnety apod. Je možné vyrobit i archy těsnicí fólie s křídélky podél delší strany archu a k tomu odpovídající tvar automatického uzavírače PCR destiček, ale to je méně výhodné, neboť by nebyly využívány standardně komerčně vyráběné archy.

Objasnění výkresů

50

Podstata vynálezu je dále objasněna na příkladech jeho uskutečnění, které jsou popsány s využitím připojených výkresů, kde na:

obr. 1 je schematicky znázorněn automatický uzavírač PCR destiček dle vynálezu s půlválcovým tělem a s upínacím prvkem ve formě pouzdra s magnety a zábranami

55

obr. 2 je schematicky znázorněn automatický uzavírač PCR destiček dle vynálezu s upínacími prvky ve formě klipu

- 5 obr. 3 je schematicky znázorněn automatický uzavírač PCR destiček dle vynálezu s upínacím prvkem ve formě prostých magnetů

obr. 4 je znázorněno přichycování těsnicí fólie

- 10 obr. 5 je schematicky znázorněno tělo automatického uzavírače PCR destiček s výsekovou plochou provedenou jako přímá spojnice mezi koncovými body chybějící části kružnice

obr. 6 je schematicky znázorněno tělo automatického uzavírače PCR destiček s výsekovou plochou provedenou jako klasická 90° kruhová výseč

- 15 obr. 7 je schematicky znázorněno tělo automatického uzavírače PCR destiček s výsekovou plochou provedenou jako klasická 270° kruhová výseč

- 20 obr. 8 je schematicky znázorněn detail rozepřeného upínacího prvku ve formě pouzdra se zábranami

obr. 9 je schematicky znázorněn detail stlačeného upínacího prvku ve formě pouzdra se zábranami

25

Příklady uskutečnění vynálezu

Uvedená uskutečnění znázorňují příkladné varianty provedení vynálezu, která však nemají z hlediska rozsahu ochrany žádný omezující vliv.

30

- Jedním příkladem uskutečnění dle vynálezu je automatický uzavírač PCR destiček pro plynotěsné uzavírání jamek 8 v PCR destičkách 7 pomocí těsnicí fólie, znázorněný na obr. 1, který má tělo 1 automatického uzavírače PCR destiček ve tvaru částečně vyseknutého válce, konkrétně ve tvaru půlválce, tedy s výsečí kruhové podstavy o úhlu 180°. Dále tento automatický uzavírač PCR destiček obsahuje závěs 12 a upínací prvek 6 ve formě pouzdra 13 se čtyřmi magnety 14 a čtyřmi zábranami 15 pro přichycení konců těsnicí fólie k tělu 1 automatického uzavírače PCR destiček. Automatický uzavírač PCR destiček na obr. 1 dále má tělo 1 automatického uzavírače PCR destiček duté, které je částečně tvořeno válcovou plochu 2 pláště pro silové přenesení těsnicí fólie na horní pevnou okrajovou část jamek tlakem a kolíbatým valivým pohybem těla automatického uzavírače PCR destiček, výsekovou plochu 3 pláště obdélníkového tvaru a bočními deskami. Boční desky těla 1 automatického uzavírače PCR destiček jsou půlkruhové desky otočným spojem 4 spojené se závěsem 12. Osa 5 otáčení těla 1 automatického uzavírače PCR destiček je shodná s osou pomyslného válce, jehož základem je válcová plocha 2 pláště. Závěs 12 je dále posuvně spojen s programovatelným polohovacím zařízením 11. V jiném příkladném provedení se mohou celé boční desky těla 1 automatického uzavírače PCR destiček protáčet v rámci obvodových stěn válce a být tak součástí otočného spoje 4.

- V příkladném provedení na obr. 1 je upínací prvek 6 ve formě pouzdra 13, kde spodní část pouzdra 13 rozměrově a tvarově kopíruje obdélníkovou výsekovou plochu 3 pláště a uvnitř tohoto pouzdra 13 jsou ve spodní části pouzdra 13 uloženy čtyři magnety 14. Výseková plocha 3 pláště je z oceli. Válcová plocha 2 pláště je ze silikonu. Pouzdro 13 je propojeno s výsekovou plochou 3 pláště pomocí čtyř zábran 15 stávajících se z těla 16 zábrany a dvou hlav 17, kde jedna hlava 17 zábrany 15 je uložena v dutém tělu 1 automatického uzavírače PCR destiček a druhá hlava 17 zábrany je uložena v dutém pouzdře 13, což je detailně znázorněno na obr. 8. a 9. Tělo

55

16 zábrany prochází otvorem ve výsekové ploše 3 pouzdra a otvorem ve spodní části pouzdra 13, kde každý otvor je užší než příslušná hlava 17. Tělo 16 každé zábrany je opatřeno rozpěrnou pružinou 18 překonávající magnetickou sílu u odděleného těla 1 automatického uzavírače PCR destiček od pouzdra 13, ale nepřekonávající magnetickou sílu pouzdra 13 stlačeného k tělu 1 automatického uzavírače PCR destiček. Magnety 14 a zábrany 15 jsou rozmístěny rovnoměrně v rozích obdélníku při vnitřním obvodu výsekové plochy 3 pláště. Zábřana 15 je tvořena kovovou tyčinkou se závity v koncových částech a s kovovou maticí na každém konci kovové tyčinky. V jiném příkladném provedení je jako zábřana 15 použit šroub s velkou hlavici a s maticí na druhém konci. Pouzdro 13 je v tomto příkladném provedení plastové, v jiných příkladných provedeních bylo použito teflonové, hliníkové, z nerez oceli a silikonové. V jiných příkladných provedeních byla válcová plocha pláště z kovu, hliníku, nerez oceli, teflonu.

Je-li tedy pouzdro 13 manuálně nebo samovolně po uvolnění těsnicí fólie odděleno od těla 1 automatického uzavírače PCR destiček, je díky pružinám 18 udržováno oddělené, dokud se manuálně nestlačí k tělu 1 automatického uzavírače PCR destiček. Po stlačení díky větší magnetické síle drží pouzdro 13 u těla 1 automatického uzavírače PCR destiček a zároveň pokud je mezi ně předem sevřena těsnicí fólie 10, přidržuje tuto těsnicí fólii 10 za její konce, dokud nedojde k přenosu a přitlačení těsnicí fólie 10 na PCR destičku 7, kdy síly mezi těsnicí fólií 10 a PCR destičkou 7 převáží a pohybem automatického uzavírače PCR destiček dojde k vytažení konců těsnicí fólie 10 původně přichycených magnetickou silou mezi upínací prvek 6 a tělo 1 automatického uzavírače PCR destiček.

Automatický uzavírač PCR destiček dle obr. 1 obsahuje čtyři pružné piny 19 s hrotem pro spolehlivé přichycení těsnicí fólie 10, které vedou elektrický proud, není-li mezi tělo automatického uzavírače PCR destiček a přitlačný prvek vložena těsnicí fólie. Tyto piny 19 s hroty jsou připevněny k pružinové západce. V nepřítomnosti těsnicí fólie 10 na ně není vyvíjen a zaznamenáván dostatečný tlak, jsou v klidové poloze. V přítomnosti těsnicí fólie 10 přitlačené k tělu 1 automatického uzavírače PCR destiček jsou piny 19 s hrotem více zatlačeny do těla 1 automatického uzavírače PCR destiček oproti klidové poloze, a neprochází jimi proud, což je analyzátozem pro automatický diagnostický PCR proces zaznamenáno. Piny 19 s hrotem jsou umístěny v blízkosti okrajů koncových částí vložené přichycené těsnicí fólie 10 a při detekování špatné polohy těsnicí fólie 10 analyzátozem pro automatický diagnostický PCR proces tuto chybu pomocí pinů 19 s hrotem zaznamená a signalizuje před započatím analytického diagnostického PCR procesu.

Válcová plocha 2 pláště v příkladném provedení dle obr. 1 odpovídá rozměrům klasické analytické PCR destičky 7, tedy má rozměry 115 mm krát 80 mm, které odpovídají komerčně vyráběné těsnicí fólii 10 pro PCR analýzu tak, že okraje těsnicí fólie 10 jsou založeny pod upínací prvek 6, přičemž těsnicí fólie 10 má celkové rozměry 140 mm x 80 mm a rozměr bez zahnutých okrajů zaujímá 115 mm x 80 mm, a pro tento rozměr jsou uzpůsobeny rozměry válcové plochy 2.

V jiném příkladném provedení měla válcová plocha 2 rozměry 125 mm x 85 mm.

V dalším příkladném provedení měla válcová plocha 2 pláště rozměry 80 mm krát 60 mm.

Detail uvedeného upínacího prvku 6 z obr. 1 v rozepřeném stavu je znázorněn na obr. 8, a v stlačeném stavu na obr. 9.

Automatický uzavírač PCR destiček byl vytvořen k uzavírání jamek 8 v PCR destičkách 7 naplněných alespoň z části chemikáliemi pro PCR analýzu. Před zahájením PCR analýzy byl nejprve oddělen upínací prvek 6 od těla 1 automatického uzavírače PCR destiček, ze středu archu komerčně vyráběné těsnicí fólie 10 pro PCR analýzu byl sejmuto ochranný kryt a v otevřeném analyzátozem pro automatický diagnostický PCR proces byla manuálně na válcovou plochu 2 pláště půlválcového těla 1 automatického uzavírače PCR destiček přichycena těsnicí fólie 10 tak,

že středová část fólie 10 byla přiložena na válcovou plochu 2 pláště a každý konec opatřený páskem ochranného krytu obdélníkového archu těsnicí fólie 10 byl založen k výsekové ploše 3 pláště a tyto konce byly přichyceny přitlačením upínacího prvku 6 ve formě pouzdra 13 s magnety 14. V rámci provedení izolace nukleových kyselin a ostatních přípravných úkonů a nastavení analyzátoru (PCR setup) pro automatický diagnostický PCR proces byly do PCR destičky 7 automaticky napipetovány kapalné chemikálie pro PCR analýzu. V dalším kroku bylo potřeba PCR destičku 7 plynotěsně uzavřít, což bylo provedeno automatizovanými naprogramovanými kroky v analyzátoru pro automatický diagnostický PCR proces tak, že automatický uzavírač PCR destiček opatřený těsnicí fólií 10 byl přiveden do pozice nad PCR destičku 7 pro plynotěsné uzavření. Těsnicí fólie 10 byla dále prostřednictvím naprogramovaného polohovacího zařízení 11 a automatického uzavírače PCR destiček přitlačena k PCR destičce 7 především na horní pevnou okrajovou část 9 jamky 8 a v podstatě na celý horní povrch PCR destičky 7 a trojnásobným dopředným a zpětným kolibavým valivým pohybem přenesena na horní povrch PCR destičky 7, v podstatě válcováním od jednoho konce PCR destičky ke druhému, přičemž konce těsnicí fólie 10 byly samovolně vytaženy ze sevření mezi výsekovou plochou 3 pláště a upínacím prvkem 6. Tímto byly všechny jamky 8 v PCR destičce 7 plynotěsně uzavřeny. Následně byl automatického uzavírače PCR destiček uveden do parkovací polohy tak, aby nepřekážel v následující vlastní PCR analýze a těsnicí fólií 10 utěsněná PCR destička 7 byla dále překryta a přitlačena topnou deskou a automatizovaně provedena vlastní PCR analýza pomocí polymerázové řetězové reakce, amplifikace a detekce cílové molekuly nukleové kyseliny.

Na obr. 4 je znázorněn způsob vkládání a přichycování těsnicí fólie 10 na tělo 1 automatického uzavírače PCR destiček, přičemž obdélníkový arch těsnicí fólie 10 obsahuje dva konce se samostatnými pásy ochranného krytu, tzv. křídla, která se s neodstraněným ochranným krytem vkládají mezi upínací prvek 6 a výsekovou plochu 3 pláště těla 1 automatického uzavírače PCR destiček.

V dalším příkladném provedení byla PCR destička v samostatném stojánku utěsněna automatickým uzavíračem PCR destiček dle vynálezu.

Dalším příkladem uskutečnění je neznázorněné provedení upínacího prvku 6 ve formě pouzdra 13 s jedním magnetem 14 a jednou zábranou 15.

Upínacím prvkem 6 mohou být různá jiná provedení zajišťující přidržení těsnicí fólie 10 na těle 1 automatického uzavírače PCR destiček. Mohou to být vzájemně přitahující se magnety 14, kde jeden kus je implementovaný do těla 1 automatického uzavírače PCR destiček a druhý k němu přiléhající přes těsnicí fólii 10 nebo magnety 14 umístěné v pouzdře 13, přičemž jeden z magnetických protikusů může být nahrazen feromagnetickým materiálem, ale také mohou to být různé klipy, kolíky a jiné přichytné prvky. Upínací prvky 6 ve formě klipů znázorňuje obr. 2 nebo ve formě prostých magnetů 14 znázorňuje obr. 3.

V příkladech uskutečnění znázorněných na obr. 1 až 4 bylo tělo 1 automatického uzavírače PCR destiček půlválcové, tedy výseková plocha 3 pláště byla rovná a vzhledem k bočním stěnám těla 1 automatického uzavírače PCR destiček provedená jako klasická 180° kruhová výseč. Příklady uskutečnění těla 1 automatického uzavírače PCR destiček jiného než ve tvaru půlválce, znázorňují například obr. 5 až 7. Na obr. 5 je schematicky znázorněno tělo 1 automatického uzavírače PCR destiček s rovnou výsekovou plochou 3 provedenou vzhledem k bočním stěnám těla 1 automatického uzavírače PCR destiček jako přímá spojnice mezi koncovými body chybějící části kružnice. Na obr. 6 je schematicky znázorněno tělo 1 automatického uzavírače PCR destiček s výsekovou plochou 3 tvořenou dvěma na sebe kolmými rovinami a vzhledem k bočním stěnám těla 1 automatického uzavírače PCR destiček provedenou jako klasická 90° kruhová výseč, a na obr. 7 jako klasická 270° kruhová výseč.

Průmyslová využitelnost

Automatický uzavírač PCR destiček dle vynálezu se uplatní především v laboratorních nebo mobilních zařízeních pro PCR analýzy. Utěsňování těsnicí fólie na PCR destičku je také možné provádět mimo analyzátor pro automatický diagnostický PCR proces v samostatném stojánku. Další využití se týká analýz pracujících s analytickými destičkami, například mikrotitračními, kde je z různých důvodů, nejčastěji nežádoucího odparu chemikálií, nutné či vhodné chemikálie v analytických destičkách utěsnit.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob plynotěsného uzavírání jamek v PCR destičkách automatickým uzavíračem PCR destiček pro automatický diagnostický PCR proces v analyzátoru, při kterém se alespoň z části chemikáliemi naplněná PCR destička plynotěsně uzavře pomocí těsnicí fólie, která se přenese a přitlačí na horní pevnou okrajovou část jamek PCR destičky, **vyznačující se tím**, že se nejprve před započetím diagnostického PCR procesu v analyzátoru na tělo (1) automatického uzavírače PCR destiček umístí a k tělu (1) automatického uzavírače PCR destiček přichytí těsnicí fólie (10) a automatický uzavírač PCR destiček se ustaví do své parkovací polohy tak, aby nepřekážel, dále se v průběhu diagnostického PCR procesu naplní jamky (8) PCR destičky (7) chemikáliemi, automatický uzavírač PCR destiček se navede polohovacím zařízením (11) do pozice pro plynotěsné uzavírání a provede se plynotěsné uzavírání těsnicí fólií (10), při kterém se tato těsnicí fólie (10) přitlačí a přenese z těla (1) automatického uzavírače PCR destiček opatřeného těsnicí fólií (10) na horní pevnou okrajovou část (9) jamek PCR destičky tlakem a kolébavým valivým pohybem těla (1) automatického uzavírače PCR destiček, přičemž po utěsnění těsnicí fólií (10) se automatický uzavírač PCR destiček navede zpět do parkovací polohy.

2. Způsob plynotěsného uzavírání jamek v PCR destičkách dle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se přichycení těsnicí fólie (10) k půlválcovému tělu (1) automatického uzavírače PCR destiček provede manuálním vložením prvního a druhého konce těsnicí fólie (10) mezi rovnou výsekovou plochu (3) pláště půlválcového těla (1) automatického uzavírače PCR destiček a alespoň jeden upínací prvek (6) s následným přitlačováním upínacího prvku (6) k tělu (1) automatického uzavírače PCR destiček, a plynotěsné uzavírání se provede těsnicí fólií (10) za kolébavého valivého pohybu těla (1) automatického uzavírače PCR destiček.

3. Automatický uzavírač PCR destiček pro plynotěsné uzavírání jamek v PCR destičce pomocí těsnicí fólie, **vyznačující se tím**, že automatický uzavírač PCR destiček obsahuje závěs (12) a dále tělo (1) automatického uzavírače PCR destiček ve tvaru podélně vyseknutého válce obsahující jednak válcovou plochu (2) pláště pro silové přenesení těsnicí fólie (10) na horní pevnou okrajovou část (9) jamek PCR destičky (7) tlakem a kolébavým valivým pohybem těla (1) automatického uzavírače PCR destiček a jednak výsekovou plochu (3) pláště, kde tělo (1) automatického uzavírače PCR destiček je spojeno se závěsem (12) otočně spojem (4) s osou otáčení shodnou se středovou osou (5) válcové plochy a závěs (12) je dále spojen s polohovacím zařízením (11) pro horizontální a/nebo vertikální posun automatického uzavírače PCR destiček v rovině kolmé na osu otáčení těla (1) automatického uzavírače PCR destiček; automatický uzavírač PCR destiček dále obsahuje alespoň jeden upínací prvek (6) pro přichycení obou konců těsnicí fólie (10) k tělu (1) automatického uzavírače PCR destiček.

4. Automatický uzavírač PCR destiček dle nároku 3, **vyznačující se tím**, že válcová plocha (2) pláště zaujímá plášť válce v rozsahu 90° až 270° úhlu kruhové podstavy, a zbývající část do 360° je tvořen výsekovou plochou (3) pláště, přičemž válcová plocha (2) pláště odpovídá tvaru

obdélníku o minimálních rozměrech odpovídajících ploše pokrývající plochu vymezenou jamkami (8) a jejich horní pevnou okrajovou částí (9) na PCR destičce (7) k utěsnění.

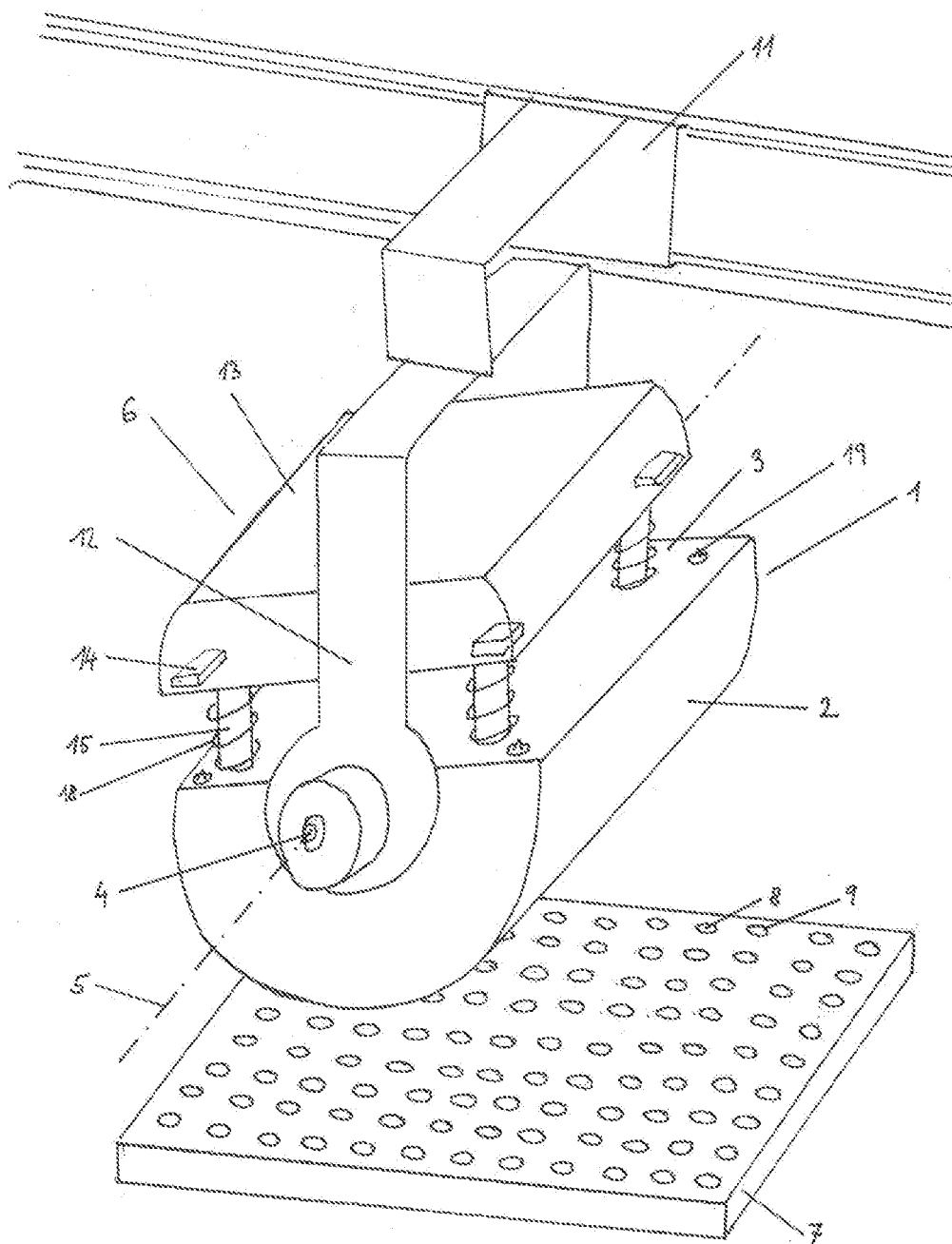
5. Automatický uzavírač PCR destiček dle nároku 3 nebo 4, **vyznačující se tím**, že tělo (1) automatického uzavírače PCR destiček má tvar půlválce.
6. Automatický uzavírač PCR destiček dle kteréhokoliv z nároků 3 až 5, **vyznačující se tím**, že upínací prvek (6) je ve formě pouzdra (13), kde spodní část pouzdra rozměrově a tvarově kopíruje výsekovou plochu (3) pláště, která je z feromagnetického materiálu, a uvnitř pouzdra (13) je ve spodní části alespoň jeden magnet (14), a dále je pouzdro (13) propojeno s výsekovou plochou (3) pláště pomocí zábrany (15) sestávající z těla (16) zábrany opatřené na svých koncích dvěma hlavami (17), kde jedna hlava (17) zábrany je uložena v tělu (1) automatického uzavírače PCR destiček, které je duté, a druhá hlava (17) zábrany je uložena v pouzdře (13), a tělo (16) zábrany prochází otvorem ve výsekové ploše (3) pláště a otvorem ve spodní části pouzdra (13), kde každý otvor je menší než příslušná hlava (17), a tělo (16) zábrany je opatřeno rozpěrnou pružinou (18) překonávající magnetickou sílu u odděleného těla (1) automatického uzavírače PCR destiček od pouzdra (13), ale nepřekonávající magnetickou sílu pouzdra (13) stlačeného k tělu (1) automatického uzavírače PCR destiček.
7. Automatický uzavírač PCR destiček dle nároku 6, **vyznačující se tím**, že v pouzdře (13) jsou čtyři magnety (14) umístěné v blízkosti rohů obdélníkové spodní části pouzdra (13) a pouzdro (13) je s výsekovou plochou (3) pláště propojeno pomocí čtyř zábran opatřených pružinami.
8. Automatický uzavírač PCR destiček dle kteréhokoliv z nároků 3 až 7, **vyznačující se tím**, že výseková plocha (3) pláště těla (1) automatického uzavírače PCR destiček obsahuje alespoň jeden, s výhodou čtyři pružné piny (19) z materiálu vedoucího elektrický proud a napojené na přívod proudu pro detekci umístění těsnicí fólie, kdy každý pin (19) je opatřený hrotem pro zamezení pohybu přichycené těsnicí fólie (10).
9. Automatický uzavírač PCR destiček dle kteréhokoliv z nároků 3 až 8, **vyznačující se tím**, že je povrch válcové plochy (2) pláště tvořen neadhezivním materiálem vůči hornímu povrchu těsnicí fólie (10).

5 výkresů

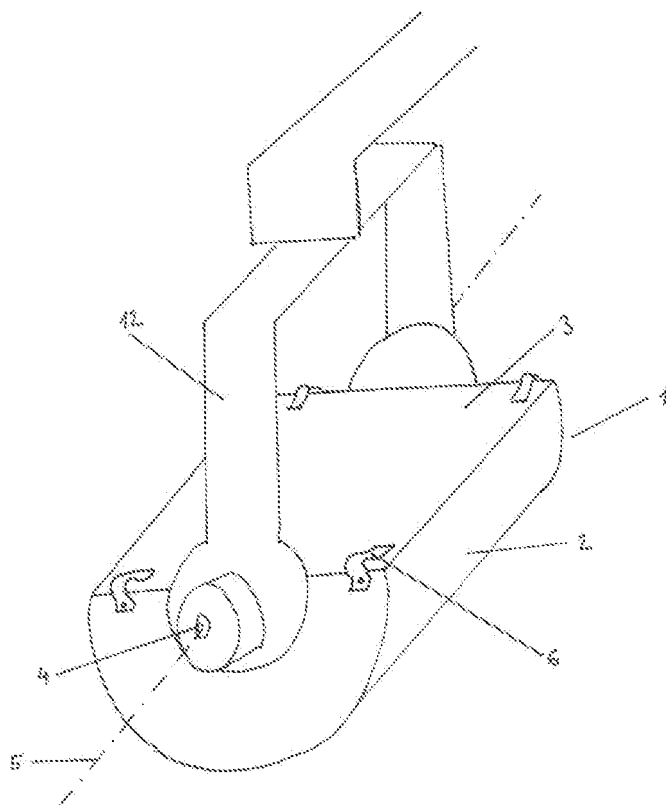
Seznam vztahových značek

- 1 - Tělo automatického uzavírače PCR destiček
- 2 - Válcová plocha pláště
- 3 - Výseková plocha pláště
- 4 - Otočný spoj
- 5 - Osa otáčení
- 6 - Upínací prvek
- 7 - PCR destička
- 8 - Jamka
- 9 - Horní pevná okrajová část jamek
- 10 - Těsnicí fólie
- 11 - Polohovací zařízení
- 12 - Závěs
- 13 - Pouzdro
- 14 - Magnet
- 15 - Zábrana
- 16 - Tělo zábrany

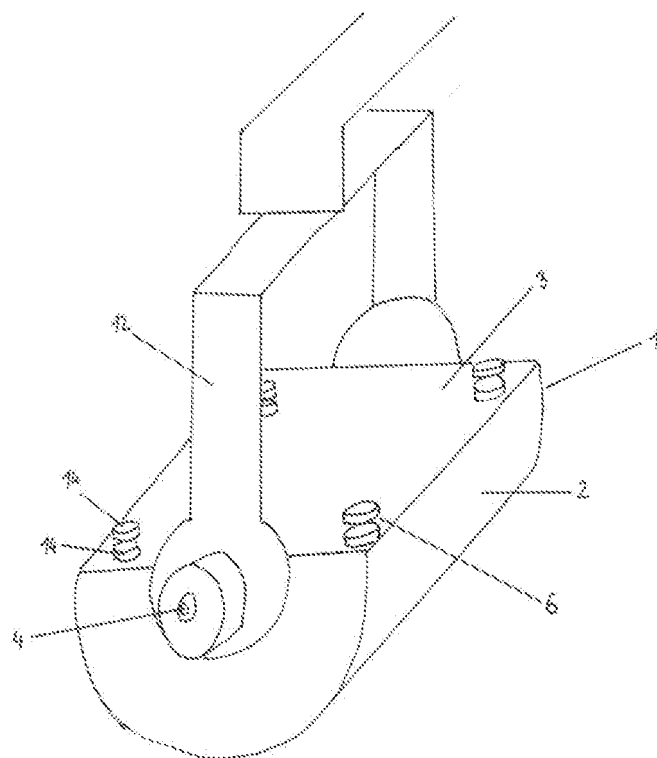
- 17 -Hlava
- 18 -Pružina
- 19 -Pin



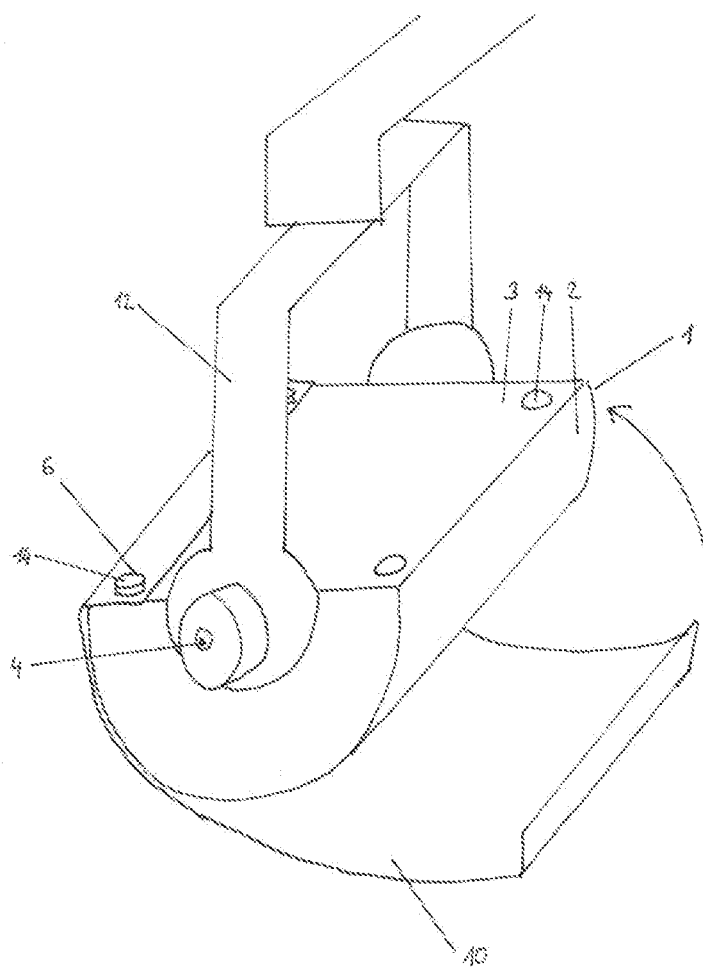
Obr. 1



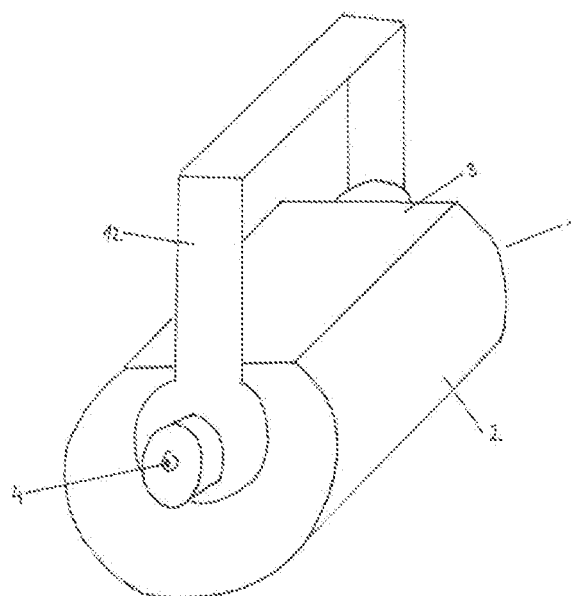
Obr. 2



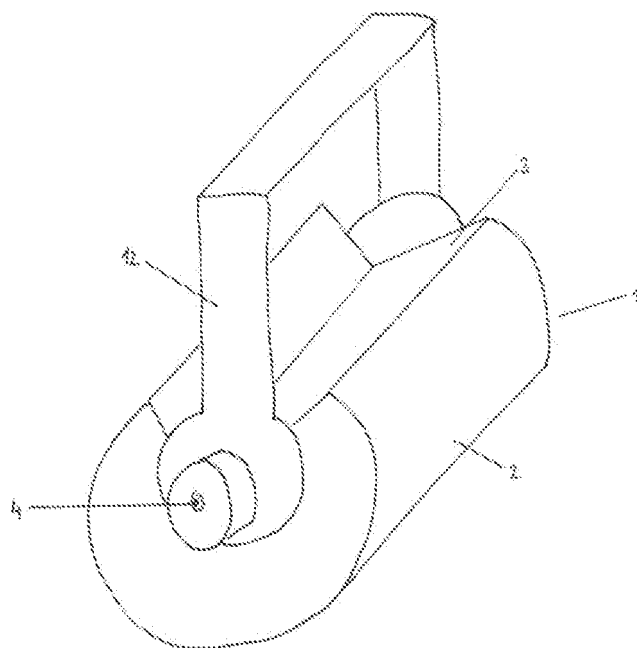
Obr. 3



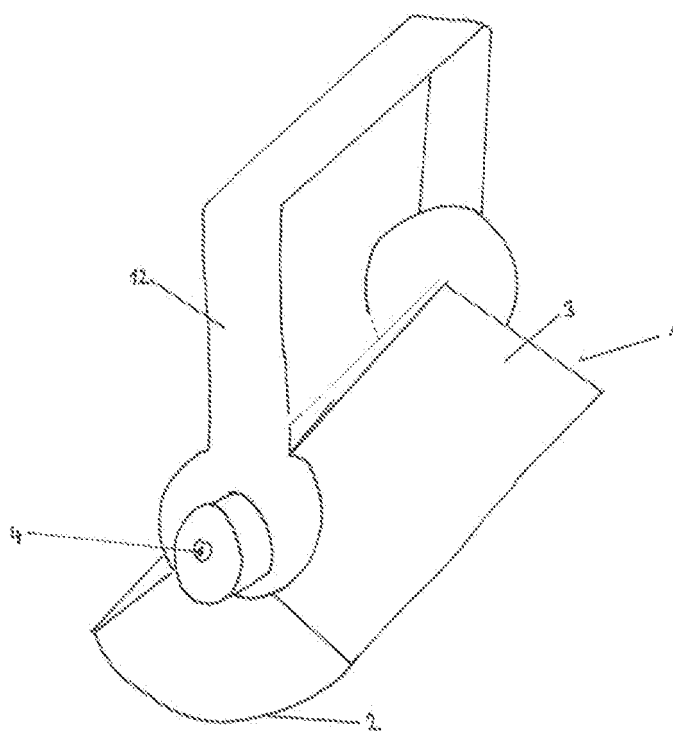
Obr. 4



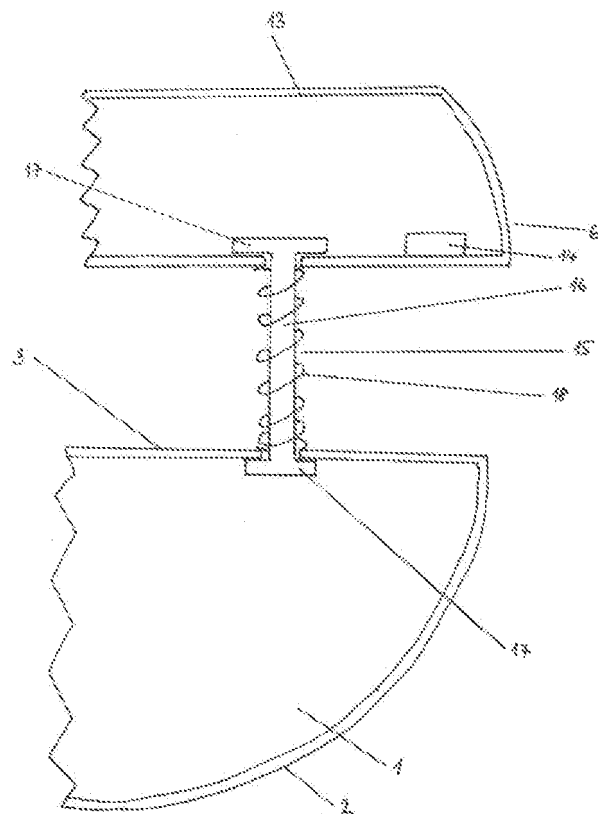
Obr. 5



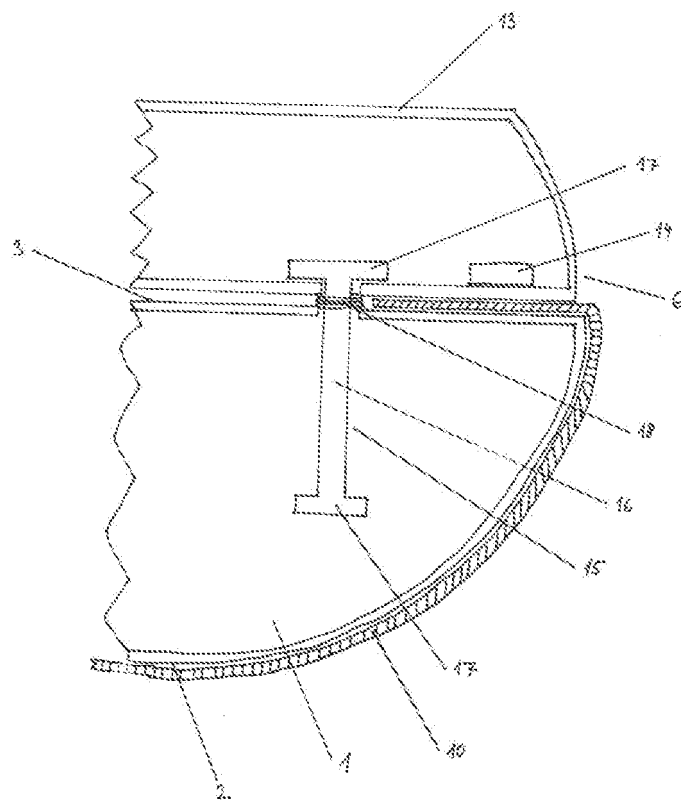
Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9