

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 946 173**

51 Int. Cl.:

G01N 1/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2013** **E 13003849 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2023** **EP 2700930**

54 Título: **Dispositivo de preparación para muestras de espectrometría de masas**

30 Prioridad:

24.08.2012 DE 102012016830

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.07.2023

73 Titular/es:

BRUKER DALTONICS GMBH & CO. KG (100.0%)
Fahrenheitstraße 4
28359 Bremen, DE

72 Inventor/es:

VOSSGRÖNE, ALEXANDER

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 946 173 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de preparación para muestras de espectrometría de masas

5 Campo de la Invención

La invención se refiere a dispositivos para la preparación de una pluralidad de ubicaciones de muestra en soportes de muestra de espectrometría de masas, en donde las muestras se preparan con líquidos de tal manera que son adecuadas para la sustancia matriz, en donde se integran asimismo las sustancias de analito disueltas. Dado que la ionización en un espectrómetro de masas, por ejemplo, ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI).

10

Antecedentes

La preparación de muestras para ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) requiere solventes orgánicos agresivos para disolver el material de matriz y aplicar las soluciones en el soporte de muestra manualmente o con la ayuda de robots de pipeteo. El solvente debe vaporizarse posteriormente para permitir el crecimiento de cristales de la sustancia matriz, en donde se integran asimismo las sustancias de analito disueltas. Dado que la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) es ampliamente conocida, no se realizará aquí una descripción detallada.

15

20

25

30

35

40

Hoy en día, la identificación por espectrometría de masas de muestras microbianas implica la preparación diaria de muchos miles de muestras en laboratorios microbiológicos para su ionización mediante desorción láser asistida por matriz. Dado que solo las sustancias del interior de los microbios son útiles para la identificación por espectrometría de masas, primero se deben alterar las células de los microbios. A menudo, esto también tiene lugar en el soporte de muestra. El primer paso aquí es aplicar pequeñas cantidades apenas visibles de alrededor de 10^5 a 10^7 microbios de colonias de placas de agar en las ubicaciones de muestra del soporte de muestra. Las células de los microbios suelen ser células disturbadas por ácidos fuertes, que posteriormente deben secarse por vaporización. Una concentración al setenta por ciento de ácido fórmico (punto de ebullición 101°C ; presión de vapor 43 hPa a 20°C) o ácido trifluoroacético de concentración similar (TFA; punto de ebullición 72°C ; presión de vapor 110 hPa a 20°C) suele utilizarse para este fin. Se aplican cantidades de alrededor de un microlitro en cada muestra; una vez que el ácido está casi seco, se aplica la solución matriz, también en cantidades de aproximadamente un microlitro. La solución matriz suele contener un ácido orgánico sólido (normalmente ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, HCCA, pero también ácido 2,5-dihidroxibenzoico, DHB, por ejemplo) en una mezcla solvente de acetonitrilo y alcoholes, por razones de seguridad normalmente etanol, aunque el metanol sería la mejor alternativa. La solución matriz penetra en los microbios a través de las paredes celulares debilitadas, provocando su ruptura y disolviendo el contenido soluble. A continuación, los microbios se identifican con la ayuda de un espectro de masas del contenido.

Los soportes de muestra suelen tener el tamaño de placas de microtitulación (o una fracción de las mismas) y hoy en día suelen tener 96 o 384 ubicaciones de muestra visibles para la aplicación y preparación de las muestras. También se utilizan soportes de muestra con 1536 ubicaciones de muestra. Las ubicaciones de muestra con diámetros de 0,8 a 2,0 milímetros se pueden identificar con la ayuda de anillos fresados, evitando los bordes fresados que los ácidos y solventes aplicados se escapan; las ubicaciones de muestra también pueden tener forma de áreas hidrófilas en un ambiente hidrófobo.

45

En la actualidad, la preparación todavía se realiza mayoritariamente de forma manual con pipetas de dispensación, sin una campana (campana de humos) ya que las campanas son raras en los laboratorios microbiológicos. Esto puede ser peligroso para la salud si la ventilación es insuficiente. Incluso cuando se dispone de una campana, a menudo no se utiliza porque el pipeteo en una campana abierta es muy complicado. Por tanto, hace tiempo que existe la necesidad de un dispositivo de preparación automática que facilite la aplicación de los ácidos y las soluciones matriz, que no libere vapores peligrosos y que, preferiblemente, no requiera una campana.

50

Las cantidades de líquido de alrededor de un microlitro no gotean desde la punta de la pipeta por sí solas, sino que deben aplicarse según el estado de la técnica dando golpecitos en la muestra. Se debe usar una punta de pipeta nueva para cada muestra para evitar que se transfieran las muestras. Por lo tanto, la aplicación sin contacto de los líquidos en las muestras sería particularmente ventajosa, ya que eliminaría la necesidad de reemplazar las puntas de pipeta en cada ocasión.

55

Para la aplicación sin contacto, es ventajoso posicionar el dispensador de manera exactamente vertical sobre las ubicaciones de muestra. Por tanto, la preparación automática requiere la provisión de dispositivos de movimiento que puedan alinear verticalmente con precisión el dispensador y las ubicaciones de muestra. Dado que los ácidos y solventes que se evaporan atacan las superficies, especialmente las superficies metálicas en contacto deslizante, no se pueden utilizar las correderas transversales habituales accionadas por motores paso a paso y husillos (como en una etapa de traslación X-Y).

60

65

Esta descripción hace referencia a la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI), en la que se producen iones durante el proceso de desorción iniciado por pulsos de rayos láser. No hace falta decir, sin embargo, que las preparaciones de muestras también serán posibles cuando las sustancias de analito en las muestras preparadas puedan transferirse a la fase gaseosa independientemente de su ionización. El tipo de ionización se puede seleccionar

según sea necesario para adaptarse a la aplicación. Por ejemplo, se puede llevar a cabo desorción láser simple en combinación con ionización química (LDCI), o ionización por electropulverización directa desde la superficie (DESI), pero también se pueden utilizar otros tipos de ionización. En consecuencia, el término "ionización con desorción láser asistida por matriz" no debe entenderse como una restricción.

Además, esta descripción menciona ocasionalmente la aplicación de una gota en una muestra. Se entiende que la gota dispensada también se puede aplicar en una ubicación de muestra sin recubrir del soporte de muestra, por ejemplo, como una etapa preparatoria para el posterior recubrimiento con una muestra microbiana. En consecuencia, las realizaciones de este tipo tampoco deben considerarse restrictivas en modo alguno.

La publicación de patente US 2002/0104583 A1 describe un colector de fracciones para dispensar líquido desde una fuente de líquido en receptáculos transportados en una mesa giratoria, en donde la mesa giratoria está conectada a la carcasa del colector de fracciones a través de un brazo de soporte de manera que la mesa giratoria está montada de forma giratoria en un extremo de dicho brazo de soporte. Dicho brazo de soporte está montado de forma giratoria en su otro extremo en la carcasa del colector de fracciones.

La publicación de patente US 2010/0090099 A1 describe un aparato de deposición de moléculas, que comprende una cámara de vacío; un aparato de traslación de matriz controlable para controlar la posición del material de matriz sin solvente dentro de la cámara cuyas moléculas se depositarán; un aparato de sublimación para sublimar las moléculas del material de matriz sin solvente; una o más matrices sin solvente cuya posición es controlable por el aparato de traslación controlable; una o más muestras que están separadas de una o más matrices sin solvente; un aparato de condensación para enfriar individualmente las muestras para depositar las moléculas sublimadas en las muestras; y un aparato de traslación de muestras controlable para controlar la posición de las muestras dentro de la cámara.

En vista de lo anterior, existe la necesidad de un dispositivo que pueda preparar automáticamente las ubicaciones de muestra en soportes de muestra de espectrometría de masas con líquidos para una posterior ionización de las muestras, por ejemplo para una ionización por desorción láser asistida por matriz, con un efecto considerablemente reducido de los vapores liberados en los dispositivos de movimiento. Es preferible que el dispositivo esté diseñado de tal manera que el usuario tampoco pueda estar en peligro por los vapores emitidos.

Sumario de la Invención

En la reivindicación independiente 1 anexa se hace referencia al dispositivo más básico según la invención. Las realizaciones preferidas se describen en las reivindicaciones dependientes 2 a 7.

La invención propone que el dispensador de líquidos y las ubicaciones de muestra en un soporte de muestra se posicionen entre sí mediante dos giros alrededor de dos ejes excéntricos. Por ejemplo, el dispensador puede montarse en un brazo giratorio y moverse sobre las ubicaciones de muestra ubicadas en una mesa de soporte de muestra, que también puede girar. O el dispensador puede ser estacionario, y las ubicaciones de muestra en el soporte de muestra se pueden mover debajo del dispensador mediante un sistema de movimiento acoplado con dos giros excéntricos. Como se utilizan ácidos y solventes agresivos que deben evaporarse en las muestras, la preparación se realiza en una cámara cerrada con circulación de aire, filtro de aire, dispensador y mesa de montaje para el soporte de muestra. Los motores de accionamiento para posicionar el dispensador y el soporte de muestra entre sí se mantienen fuera de la cámara con el eje apretado por medios de sellado, tal como juntas tóricas, porque los vapores agresivos dañarían muy rápidamente los motores. Se evitan correderas transversales complejas de etapas de traslación XY para mover los soportes de muestra, ya que crean problemas de estanqueidad difíciles de resolver.

La invención se caracteriza por un diseño especial de los dispositivos de posicionamiento, que no requiere movimientos deslizantes lineales y, por lo tanto, no tiene rieles de deslizamiento, roscas u otros elementos que son susceptibles a la corrosión y tienen superficies relativamente grandes y se dañan fácilmente. Un dispensador en un brazo giratorio, movido por un primer accionamiento, y una mesa de soporte de muestra, que gira mediante un segundo accionamiento, se pueden mover de tal manera que el dispensador quede dispuesto verticalmente sobre una ubicación de muestra seleccionada arbitrariamente en la mesa de soporte de muestra, por ejemplo. O el dispensador puede ser estacionario, y cada ubicación de muestra del soporte de muestra se puede mover debajo del dispensador mediante un sistema de movimiento acoplado con dos giros excéntricos. Las técnicas para aplicar los líquidos en las ubicaciones de muestra en pequeñas cantidades con ayuda de dispensadores que se disponen verticalmente sobre las ubicaciones de muestra y que funcionan sin contacto son en principio conocidas y pueden usarse aquí. La cámara para preparar las ubicaciones de muestra está separada de la cámara que contiene los accionamientos electromecánicos (motores de accionamiento) para posicionar el dispensador y las ubicaciones de muestra entre sí. Esta separación se puede lograr mediante una pared de cámara u otro tipo de barrera, por ejemplo. Las fuerzas requeridas para posicionar los dispensadores en relación con las ubicaciones de muestra se transmiten a través de ejes a través de aberturas selladas en la pared de la cámara en el interior de la cámara en donde se realiza la preparación.

En este sistema también se pueden montar varios dispensadores para varios tipos diferentes de líquido. Además, es posible la presencia de sensores para controlar la correcta aplicación de los líquidos. Esto no solo permite preparar las ubicaciones de muestra para la posterior aplicación de las muestras; es particularmente posible preparar muestras que ya han sido aplicadas en las ubicaciones de muestreo. Las muestras pueden ser simples muestras de analito

químicas; más particularmente pueden ser pequeñas cantidades de microbios que deben identificarse por espectrometría de masas. Las células microbianas deben alterarse para esta identificación y requieren una preparación especial con ácidos fuertes para tal propósito. Se pueden utilizar dispositivos auxiliares para lavar automáticamente cada dispensador en caso de mal funcionamiento, por ejemplo, si la sustancia matriz cristaliza en la punta del dispensador; y luego se elimina el fluido de limpieza. Una cámara utilizada como espacio de preparación está preferiblemente equipada con filtros y circulación de aire para el secado controlado de los líquidos en las ubicaciones de muestra. De este modo, no es necesaria su disposición vertical con una campana, y no hay peligros para el usuario.

El dispositivo de preparación según la invención ahorra tiempo y material en comparación con la preparación manual. El factor tiempo para la identificación de microbios es particularmente importante en el diagnóstico médico porque puede salvar vidas y acortar la duración de la enfermedad. En comparación con la preparación de muestras todavía bastante primitiva de hoy en día, en particular de muestras de microbios, se pueden utilizar métodos más inteligentes que hacen posible obtener buenos espectros de masas a partir de sólo 10^3 en lugar de 10^5 microbios con la ayuda de mejores métodos de preparación, por ejemplo. Aunque el tiempo de preparación es así más largo, el tiempo ahorrado en el cultivo sería mucho mayor.

Breve descripción de las ilustraciones

La Figura 1 muestra, por un lado, un brazo giratorio (02) con dispensador (03), que puede girar alrededor del eje (01) a lo largo del arco (04). Por otro lado, la figura muestra una mesa de soporte de muestra (06), que queda en gran parte oculta por un plato de soporte de muestra (22) dispuesto en la mesa, y que puede girar alrededor del eje (05) de tal forma que, en combinación con un giro del brazo giratorio para el dispensador, cada ubicación de muestra (puntos oscuros) en el soporte de muestra (22) se puede posicionar debajo del dispensador (03). La tabla de soporte de muestra en la posición (07) muestra la separación mínima que se requiere entre los dos ejes de giro (01) y (05) si ambos giros deben realizarse a través de una pared de la cámara desde abajo.

Las Figuras 2 a 4 muestran cómo, mediante el uso de dos mesas giratorias excéntricas (20) y (10), una ubicación de muestra (24) elegida al azar en el soporte de muestra (22) puede posicionarse debajo de un dispensador fijo (50). Desde la posición inicial en la Figura 2, la primera, la mesa giratoria pequeña (20), como se muestra en la Figura 3, gira primero el ángulo ϕ_{20} , de modo que la ubicación de muestra seleccionada (24) llega a quedar dispuesta en el círculo discontinuo (26). Este círculo discontinuo (26) está dispuesto concéntricamente con respecto al eje de la segunda mesa giratoria grande (10) y el radio representa la separación del dispensador (50) del eje de giro de la mesa giratoria grande (10). Girando la segunda mesa giratoria grande (10) el ángulo ϕ_{10} (Figura 4) y con ella la primera mesa giratoria pequeña (20), la ubicación de muestra (24) ahora se puede posicionar debajo del dispensador (50).

La Figura 5 muestra esquemáticamente un ejemplo de un posible diseño de una cámara (70) con dos mesas giratorias excéntricas según las Figuras 2 a 4. Como se muestra en las Figuras 2 a 4 anteriores, cualquier ubicación de muestra en el soporte de muestra (22) se puede posicionar con precisión debajo del dispensador (50) girando las mesas giratorias (10) y (20). Se puede usar un aumento de presión para disponer una gota suspendida (60) desde un dispensador fijo (50) con capilares concéntricos (52) en una ubicación de muestra elegida al azar sin ningún contacto. Los giros de las mesas giratorias (10) y (20) son realizados por los motores (14) y (28), por ejemplo, motores paso a paso con reductor incorporado. Los ejes para transmitir los pares están sellados por los anillos de sellado (16) y (30) y se mueven sobre cojinetes de modo que las mesas giratorias puedan moverse libremente y sin fricción (a excepción de la fricción en los sellos). La disposición también contiene dos embudos de desecho (54) y (56) en las mesas giratorias (20) y (10), que quedan dispuestos uno encima del otro cuando las dos mesas giratorias están en una posición inicial, como se muestra en la Figura 2, por ejemplo. Los dos embudos de desecho (54) y (56) tienen una forma tal que el líquido de enjuague gotea o fluye inmediatamente al siguiente embudo sin poder entrar en el espacio entre las dos mesas giratorias. Un contenedor de desecho (58) está fijado debajo de la mesa giratoria (10). Esta disposición sirve para enjuagar y limpiar el dispensador si su funcionamiento se ve afectado por la cristalización del material matriz, por ejemplo.

La Figura 6 es una representación esquemática de un diseño de cámara ligeramente diferente con el dispositivo de posicionamiento para el dispensador y la mesa de soporte de muestra según la invención. Aquí también, cualquier ubicación de muestra en el soporte de muestra (22) se puede posicionar con precisión debajo del dispensador de preparación (50) girando la mesa giratoria pequeña (20) y la mesa giratoria grande (10). El giro de la mesa giratoria grande (10) mediante el motor (14) se efectúa directamente aquí mediante el eje relativamente delgado (12), mientras que el giro de la mesa giratoria pequeña (20) se efectúa indirectamente mediante el motor (28) con el reductor incorporado a través de las dos transmisiones por correa (40/42) y (32/34) y el eje hueco (38) con el anillo de sellado (36), que es concéntrico al eje (12). Las transmisiones por correa se pueden reemplazar por conjuntos de engranajes para mejorar la precisión. El conjunto de engranajes se produce mejor con un plástico químicamente inerte, dimensionalmente estable y resistente a los solventes, tal como políimida. Esta disposición tiene una transmisión por correa o un conjunto de engranajes en la cámara de preparación, pero está cubierta por la idea básica de la invención debido a su uso exclusivo de transmisiones giratorias.

Descripción detallada

La invención se caracteriza por un diseño especial de los dispositivos de posicionamiento para el dispensador y el soporte de muestra, que en las diferentes realizaciones se caracteriza por dos movimientos de giro excéntricos en cada caso, como se representa en las Figuras 1 a 4 en particular. El dispositivo de posicionamiento se puede disponer en una cámara sellada herméticamente con filtros y circulación de aire, por ejemplo. Las técnicas para aplicar los líquidos en las ubicaciones de muestra por medio de dispensadores que están verticalmente sobre las ubicaciones de muestra y funcionan sin contacto son en principio conocidas y pueden usarse aquí. Las fuerzas requeridas para el posicionamiento relativo de los dispensadores y las ubicaciones de muestra se transmiten a la cámara de preparación como pares a través de ejes que pasan a través de aberturas selladas en la pared de la cámara. La invención se caracteriza particularmente por el hecho de que no requiere movimientos de deslizamiento lineales en la cámara de preparación y, por lo tanto, no tiene rieles de deslizamiento, roscas u otros elementos con grandes superficies de deslizamiento que son susceptibles a la corrosión.

Para la dispensación sin contacto de las pequeñas cantidades de líquido en las ubicaciones de muestra, existen diferentes tipos de soluciones técnicas, tal como dispensadores piezoeléctricos. Como puede verse en una parte de la Figura 5, es particularmente sencillo y ventajoso disponer de una unidad dispensadora (50) que tiene dos capilares concéntricos (52). Una pequeña bomba presiona una gota (60) de alrededor de un microlitro fuera del capilar central; un pequeño aumento de presión de aire u otro gas adecuado para este propósito desde el capilar circundante separa así la gota colgante (60) del capilar central y hace que caiga sobre la ubicación de muestra. El aumento de presión de gas y también la velocidad de incidencia de la gota deben ser lo suficientemente pequeños para que la gota no salpique. La deposición sin contacto de las gotas de líquido significa que ya no se requieren puntas de pipeta reemplazables para la preparación.

Como se muestra en la Figura 1, un dispensador (03) está montado en un brazo giratorio (02), y se puede guiar sobre cada ubicación de muestra en una placa de soporte de muestra (22) dispuesta en una mesa de soporte de muestra (06), que también gira. El guiado se realiza mediante el uso de los ejes (01) y (05) para establecer las dos posiciones de giro en consecuencia. El eje (01) para el brazo giratorio (02) puede entrar en la cámara por la parte superior; el eje (05) para la mesa de soporte de muestras desde abajo; sin embargo, también es posible introducir ambos ejes desde abajo. Los líquidos y gases que se requieren para la dispensación pueden suministrarse por medio de tubos o pequeñas tuberías que pasan a través de un eje hueco (01), por ejemplo. También es posible montar varios dispensadores (03) para diferentes líquidos en el brazo giratorio (02), y también sensores para la correcta deposición de los líquidos.

Una realización funciona con un dispensador fijo (50), tal como se muestra en la Figura 5, y solo se mueven las ubicaciones de muestra en el soporte de muestra (22) para su disposición debajo del dispensador (50) mediante un sistema de movimiento simple con dos giros excéntricos. Dado que el movimiento del soporte de muestra (22) debe efectuarse sin un sistema mecánico grande que es susceptible a la corrosión, el soporte de muestra (22) está dispuesto en una mesa giratoria (20), que está montada excéntricamente en o dentro de una mesa giratoria más grande (10) para poder girar. Al girar las dos mesas giratorias, cualquier ubicación de muestra del soporte de muestra (22) se puede mover debajo del dispensador de preparación (50), como se muestra en las Figuras 2 a 4. El soporte de muestra (22) puede estar insertado en la mesa giratoria (20) para proporcionar una superficie a nivel para una corriente de aire de secado. Entonces es preferible que el contorno de un rebaje en la mesa giratoria (20) se adapte a las dimensiones del soporte de muestra (22). Las mesas giratorias (10) y (20) giran mediante los motores (14) y (28), que pueden ser motores paso a paso. Los motores paso a paso pueden equiparse con reductores, discos codificadores y finales de carrera.

Para realizaciones con un dispensador fijo, es ventajoso mantener cortos sus suministros de líquido y gas. Los suministros cortos no requieren grandes cantidades de líquido para llenar las líneas de suministro, lo que facilita especialmente el trabajo de enjuague y limpieza. Las pequeñas dimensiones también evitan caídas de presión en el gas, lo que podría hacer que el aumento de presión del gas para separar una gota del capilar no sea lo suficientemente intenso. Además, con un dispensador fijo, el procedimiento de inicio para la dispensación de la gota exprimiéndola del capilar dispensador puede llevarse a cabo mientras las mesas giratorias todavía están en movimiento. Con este diseño ya no existe el peligro de que la gota se desprenda prematuramente debido a la desaceleración del movimiento de giro del dispensador, ni el peligro de que la gota realice movimientos oscilantes, lo que podría dificultar más su desprendimiento sobre la ubicación de muestra, o requeriría un período de atenuación.

Las Figuras 2 a 4 representan esquemáticamente cómo una ubicación de muestra (24) elegida al azar en el soporte de muestra (22) puede posicionarse debajo del dispensador (50) con la ayuda de las dos mesas giratorias (10) y (20). Desde la posición inicial en la Figura 2, la mesa giratoria pequeña (20) gira primero el ángulo ϕ_{20} de modo que la ubicación de muestra (24) llega a quedar dispuesta en el círculo discontinuo (26), tal como se muestra en la Figura 3. Este círculo discontinuo (26) está dispuesto de manera que sea concéntrico a la mesa giratoria grande (10). Girando la mesa giratoria grande (10) el ángulo ϕ_{10} , y con ella la mesa giratoria pequeña (20), la ubicación de muestra (24) ahora se puede disponer exactamente debajo del dispensador (50). Dado que la geometría de la disposición se conoce en detalle, los ángulos de giro requeridos ϕ_{20} y ϕ_{10} pueden calcularse matemáticamente con facilidad mediante un programa de control. Estos cálculos resultan particularmente sencillos si el radio del círculo discontinuo (26), que

representa la distancia del dispensador (50) al eje de la mesa giratoria grande (10), corresponde precisamente a la distancia entre los ejes de las dos mesas giratorias. El diámetro del círculo (26) debe ser al menos tan grande como la mitad de la distancia más grande entre las ubicaciones de muestra en el soporte de muestra (22). También es posible que los cálculos se realicen una sola vez y luego se almacenen en una tabla. Estos cálculos comprenden los ángulos de giro absolutos ϕ_{20} y ϕ_{10} para todas las ubicaciones de muestra, calculados desde la posición inicial, o los ángulos de giro relativos, calculados desde la última ubicación de muestra a la que se realizó una aproximación. Para ahorrar tiempo, los dos movimientos de giro se pueden realizar naturalmente de manera simultánea o al menos con un solapamiento temporal parcial.

Los movimientos de giro de las dos mesas giratorias pueden limitarse, por ejemplo, a más/menos 180° o un poco menos. De este modo, se pueden incorporar finales de carrera para estos límites. Limitar el movimiento de esta manera permite que las partes giratorias, tal como el motor paso a paso (28) en la Figura 5, también estén dotadas de conexiones eléctricas sin usar contactos deslizantes.

La precisión necesaria para establecer los ángulos de giro ϕ_{20} y ϕ_{10} también se puede calcular a partir de consideraciones geométricas para una precisión posicional especificada. La precisión requerida determina entonces la reducción de engranajes en los motores paso a paso (14) y (28), y el tamaño de paso de los motores paso a paso. Para garantizar un ajuste reproducible de las posiciones sin histéresis mecánica, los movimientos de giro también se pueden pretensar en una dirección mediante resortes; o bien, los movimientos a una posición de preparación siempre se pueden realizar desde la misma dirección, si es necesario, sobrepasando inicialmente la posición de destino y luego moviéndose hacia atrás.

El dispensador fijo (50) y el dispositivo de movimiento con las dos mesas giratorias (10) y (20) están dispuestos en una cámara (70) sellada herméticamente, mientras que los motores de accionamiento, engranajes y discos codificadores se encuentran fuera de la cámara para protegerlos de los vapores agresivos. En la Figura 5 se muestran posibles disposiciones con anillos de sellado (16, 30) para el sellado de los ejes que transmiten los pares al interior de la cámara (70). Los anillos de sellado pueden tener forma, por ejemplo, de juntas tóricas, pero también son adecuados los sellos de eje radiales con labios de sellado. Sin embargo, el paso para el "eje" de la mesa giratoria grande (10) con el anillo de sellado (16) debe ser muy grande, por lo que este sello debería tener un labio de sellado suelto para no obstruir demasiado el movimiento de giro.

También es posible diseñar el espacio entre la mesa giratoria grande (10) y el piso de la cámara de tal manera que en lugar de, o además de, el anillo de sellado (16), se pueda llenar al menos parcialmente con un aceite de baja viscosidad de presión de vapor extremadamente baja. El aceite de bomba de difusión comercial es particularmente adecuado. El aceite de bomba de difusión es extremadamente resistente a la oxidación y al envejecimiento y tiene una presión de vapor difícilmente medible a las temperaturas utilizadas. Se mantiene en el espacio por efecto capilar y sus propiedades lubricantes facilitan el movimiento de giro. La separación en el espacio se puede mantener mediante almohadillas deslizantes de baja resistencia a la fricción, si es necesario. Lo mismo se aplica al espacio entre la mesa giratoria grande (10) y la mesa giratoria pequeña (20). El aceite también sirve particularmente para sellar la cámara con el fin de evitar la entrada de vapores corrosivos en el espacio que contiene los motores sensibles (14, 28). Estos se pueden recubrir oleofóbicamente en los bordes, por ejemplo con aminoácidos oleofóbicos, para que el aceite no se escape. También es posible cerrar los espacios en los bordes pegando tiras de papel secante o fieltro fino.

Cabe señalar aquí que, dentro del alcance de la invención, también es posible una realización en la que dos mesas giratorias excéntricas, cuyos ejes se extienden en el interior de la cámara desde arriba, podrían mover un dispensador montado en las mismas sobre las ubicaciones de muestra en un soporte de muestra estacionario. Sin embargo, esta realización no se explica en mayor detalle aquí.

A continuación se describirá brevemente otra realización, que se representa en la Figura 6, y muestra una representación esquemática de un diseño ligeramente diferente de los dispositivos de movimiento en la cámara de preparación. En este caso, también, cualquier ubicación de muestra del soporte de muestra (22) se puede posicionar con precisión debajo del dispensador de preparación (50) girando la mesa giratoria pequeña (20) y la mesa giratoria grande (10). Mientras que el giro de la mesa giratoria grande (10) se realiza directamente mediante el motor (14) a través del eje relativamente delgado (12), el giro de la mesa giratoria pequeña (20) se realiza indirectamente mediante el motor (28), con reductor incorporado, a través de las dos transmisiones por correa (40/42) y (32/34) y el eje hueco (38) con el anillo de sellado (36), que es concéntrico al eje (12). Las transmisiones por correa se pueden reemplazar por un conjunto de engranajes para mejorar la precisión. El conjunto de engranajes en la cámara de preparación se produce mejor con un plástico químicamente inerte, dimensionalmente estable y resistente a los solventes, tal como poliimida.

Es ventajoso para todas las realizaciones que la cámara (70) como volumen de preparación esté dotada de circulación de gas y filtros opcionales (no mostrados aquí). La cámara se puede diseñar así como parte de un instrumento de sobremesa que no tiene que disponerse en una campana (campana de gases). Los filtros pueden ser simples filtros de carbón en tamaños estándar, por ejemplo. El gas filtrado, tal como aire de laboratorio, del que se han eliminado los solventes, los ácidos y el exceso de humedad, se vuelve a suministrar de tal manera que fluye lentamente sobre la superficie del soporte de muestra para secar las muestras. La humedad del gas circulante también se puede controlar.

La cámara puede estar dotada de una tapa, que puede abrirse manualmente para insertar los soportes de muestra. Por razones de seguridad, la tapa debería cerrarse automáticamente cuando se suelta. La tapa también sirve así como medida de seguridad para proteger contra explosiones: si explota una mezcla de solvente y aire, la tapa se levanta ligeramente y deja escapar los gases de la explosión, evitando así que la cámara se destruya.

Para una vaporización más rápida de los líquidos, es conveniente poder calentar la mesa de soporte de muestras (06), la mesa giratoria (10) y, adicional o alternativamente, la mesa giratoria (20), a una temperatura determinada, por ejemplo, hasta 40°C, por medio de un elemento de calentamiento incorporado con sensor de temperatura. Los cables eléctricos para la corriente de calentamiento y los sensores de temperatura pueden pasar a través del eje (12), por ejemplo, que debe ser hueco para tal fin. Por otro lado, también es posible calentar la corriente de gas circulante en consecuencia.

En este sistema también pueden estar presentes varios dispensadores para varios tipos diferentes de líquido. Aunque no es necesario, es sin embargo especialmente favorable que los diferentes dispensadores estén todos dispuestos en el círculo discontinuo (26) de las Figuras 2 a 4. Además, se pueden instalar sensores que controlan la correcta aplicación del líquido en este círculo o en otras ubicaciones del dispositivo. Un sensor de este tipo puede tener forma de una minicámara, por ejemplo, cuyas imágenes pueden evaluarse visual o automáticamente. También es posible usar sondas que miden la capacitancia eléctrica en la ubicación de muestra o la luz dispersada reflejada desde la ubicación de muestra.

Los dispensadores deben limpiarse de vez en cuando para eliminar los residuos que interfieren, por ejemplo, material matriz cristalizado. El material matriz cristalizado en el borde del capilar dispensador central hace que las gotas ya no se desprendan verticalmente. El capilar se puede limpiar enjuagándolo con solvente puro, por ejemplo. Como se muestra en la Figura 5, las dos mesas giratorias (20, 10) pueden incorporar dos embudos de desecho (54) y (56) que quedan dispuestos precisamente uno encima del otro cuando las dos mesas giratorias están en una posición inicial, como se muestra en la Figura 2, por ejemplo. Los dos embudos de desecho (54) y (56) tienen la mejor forma para que el líquido de enjuague gotee o fluya inmediatamente al siguiente embudo sin poder entrar en el espacio entre las dos mesas giratorias. Un contenedor de desecho (58) está fijado debajo de la mesa giratoria (10). La limpieza del dispensador también puede ser asistida por un cepillo que se instala en posición fija en la mesa giratoria (10), junto al embudo (54), y que cepilla la boquilla desde abajo con la ayuda de un ligero giro en vaivén de una de las dos mesas giratorias. Durante el enjuague, el solvente se escurre al contenedor de desecho (58). El contenedor de desecho puede equiparse con una bomba (no se muestra aquí) para bombear el líquido de enjuague.

Con este dispositivo para la preparación de ubicaciones de muestra en soportes de muestra, es posible preparar ubicaciones de muestra para la posterior aplicación de muestras, y es especialmente posible preparar muestras que ya se han aplicado en ubicaciones de muestra. Las muestras pueden ser simples muestras de análisis químicas, pero en particular pueden ser pequeñas cantidades de microbios que deben identificarse por espectrometría de masas. Las células microbianas deben ser alteradas para esta identificación y, como se describió anteriormente, requieren una preparación especial con ácidos fuertes para tal propósito.

A continuación se describirá brevemente la implementación de un método manual, que se usa a menudo hoy en día para la preparación por MALDI de muestras de microbios en un soporte de muestra con la ayuda de un dispositivo que está diseñado según los principios de esta invención. Después de levantar manualmente la tapa de la cámara, se puede retirar un soporte de muestra completamente preparado y cambiarlo por un soporte de muestra recién recubierto con muestras. El soporte de muestra está en un rebaje en la mesa giratoria pequeña (20), pero se puede levantar y extraer con unos orificios de agarre para los dedos (no se muestran en las figuras) o con herramientas especiales. El soporte de muestra se lleva a la temperatura deseada en solo unos minutos. Las muestras de microbios, que ya se encuentran en las ubicaciones seleccionadas en el soporte de muestra, ahora se rocían sin contacto con alrededor de un microlitro de ácido fórmico, muestra a muestra. Las muestras se pueden recubrir fila a fila, por ejemplo, para mantener pequeñas las distancias de movimiento y así ahorrar tiempo. Sin embargo, también pueden ser óptimas otras secuencias, por ejemplo, recubriendo en cuadrantes. Una muestra se puede mover y recubrir en alrededor de medio segundo; todas las muestras de un soporte de muestra con 384 muestras se recubren así por completo con ácido fórmico en unos 3,2 minutos. Este tiempo es suficiente para digerir las células microbianas; las paredes de las células se debilitarán al menos hasta tal punto que se puedan hacer estallar por ósmosis en el momento en que se aplique la solución matriz. Si la temperatura de calentamiento se elige correctamente, en el momento en que se haya aplicado la última muestra, la primera muestra se habrá secado lo suficiente como para aplicar la solución del material matriz. Se necesitan otros 3,2 minutos para aplicar el material matriz en todas las muestras (en la misma secuencia). Si se calculan otros cinco minutos para el secado final con cristalización de la sustancia matriz, solo se necesitan aproximadamente 15 minutos para preparar las 384 muestras, incluido el calentamiento inicial; por lo tanto, se pueden preparar alrededor de cuatro soportes de muestra por hora. Si los recubrimientos se comprueban con sensores, es de esperar que lleve más tiempo, pero aquí también, un soporte de muestra tarda como máximo media hora en prepararse.

El dispositivo de preparación según la invención ahorra tiempo en comparación con la preparación manual. También ahorra puntas de pipeta. En el diagnóstico médico, no solo el factor coste, sino también el factor tiempo para la

identificación de microbios desconocidos, es especialmente importante porque la identificación temprana de los microbios puede salvar vidas y acortar significativamente la duración de las enfermedades.

En la breve descripción del método de preparación para muestras de microbios con el dispositivo según la invención se implementó únicamente el método de preparación que se usa comúnmente hoy en día. Sin embargo, también es concebible que, en comparación con la preparación de microbios aún bastante primitiva de hoy en día, se puedan usar métodos más inteligentes que permitan obtener buenos espectros de masas a partir de solo 10^3 en lugar de 10^5 microbios, aumentando el rendimiento de iones en el espectrómetro de masas, por ejemplo. Aunque el tiempo de preparación es así más largo, el tiempo ahorrado en el cultivo sería mucho mayor.

Hoy en día, por ejemplo, se debate si las proteínas liberadas durante la digestión celular no se pueden unir firmemente a las capas de adsorción de proteínas, tal como las capas de dinitrocelulosa, y luego enjuagarse con agua para eliminar las sales, pero también otras sustancias que impiden la ionización ("inhibidores"), antes de aplicar la solución matriz. Un dispensador de enjuague simple puede constar de un capilar exterior para suministrar el agua de enjuague y un capilar interior para eliminar el agua de enjuague por succión. El dispensador de enjuague se dispone apenas a medio milímetro sobre la muestra que se va a enjuagar. Dado que el enjuague siempre se realiza con agua de enjuague fresca, no hay necesidad de preocuparse de que se transfieran proteínas en este proceso. También es posible enjuagar con líquidos distintos del agua, para eliminar los ácidos grasos, por ejemplo. De esta forma, la cámara de preparación con el dispositivo según la invención no sólo se puede utilizar para los métodos de preparación comúnmente empleados en la actualidad, sino que también permite realizar en el futuro métodos más complejos que son difíciles de realizar manualmente, posiblemente con la instalación de otros dispensadores o incluso sensores, cuando sea necesario.

Por supuesto, el dispositivo según la invención también permite la preparación de soportes de muestra en los que no todas las ubicaciones de muestra están recubiertas con muestras. Las posiciones recubiertas con muestras deberán ser notificadas al programa de control para tal efecto.

El posicionamiento del soporte de muestra con la ayuda de dos movimientos de giro, tal como se presenta en esta descripción, puede representar una oportunidad para alejarse de los diseños rectangulares de soportes de muestra conocidos del estado de la técnica (y también mostrados en las figuras) y elegir en cambio diseños redondos adaptados a los giros. Por ejemplo, en lugar de la disposición matricial habitual de las ubicaciones de muestra en el soporte de muestra en filas y columnas, puede ser útil adoptar una disposición en círculos imaginarios con diferentes diámetros, concéntricos al eje de giro de la mesa giratoria, o alternativamente en una curva en espiral imaginaria que va desde el borde hasta el centro del soporte de muestra y tiene el eje de giro de la mesa giratoria como su centro. Una característica particular es que las ubicaciones de muestra pueden disponerse a lo largo de una línea imaginaria desde el centro del círculo hasta la circunferencia en las mismas posiciones angulares, pero en diferentes radios. Un experto en la técnica podrá utilizar fácilmente consideraciones geométricas para encontrar un diseño particularmente ventajoso de soporte de muestra.

En el marco de esta descripción, los términos "excéntrico" y "movimientos de giro excéntricos" se utilizan para indicar que los dos ejes de giro (esencialmente paralelos) para posicionar la mesa de soporte de muestra y el dispensador entre sí están dispuestos a una distancia entre sí. No significan que los elementos que giran alrededor de estos ejes, tal como el brazo giratorio o las mesas giratorias, deban tener un diseño giratoriamente simétrico con respecto a estos ejes (aunque tal diseño puede ser ventajoso en algunos casos por razones de producción o por razones de equilibrio de masas, por ejemplo).

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para la preparación de muestras para ionización en un espectrómetro de masas, que comprende:

- 5 una cámara sellable (70);
una mesa (06; 20) para recibir un soporte de muestra (22); y
un dispensador (03; 50) para dispensar líquidos en ubicaciones de muestra (24) del soporte de muestra (22)
en la mesa (06; 20);
que comprende además accionamientos con ejes asociados (12, 38) para efectuar un posicionamiento relativo
10 del dispensador (03; 50) y las ubicaciones de muestra (24) en el soporte de muestra (22) entre sí mediante dos
giros alrededor de dos ejes excéntricos;
caracterizado por que
tanto la mesa (06; 20) como el dispensador (03; 50) están dispuestos en la cámara sellable (70), los
accionamientos están dispuestos fuera de la cámara sellable (70) y los ejes (12, 38) transmiten fuerzas de
15 accionamiento desde allí al interior de la cámara sellable (70) a través de una abertura de pared de cámara
sellada.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, en donde la cámara (70) está dotada de medios de circulación de gas y filtros
asociados.
- 20 3. Dispositivo según la reivindicación 1 ó 2, en donde el soporte de muestra (22) está dispuesto en una mesa giratoria
pequeña (20), que está montada excéntricamente sobre una mesa giratoria más grande (10) o en la misma.
- 25 4. Dispositivo según la reivindicación 3, en donde el soporte de muestra (22) está insertado en la mesa giratoria
pequeña (20) para proporcionar una superficie a nivel para una corriente de aire de secado.
5. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la distancia del dispensador (50) al eje de
la mesa giratoria grande (10) corresponde precisamente a la distancia entre los ejes de las dos mesas giratorias (10,
20).
- 30 6. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde un sellado de los ejes (12, 38) que transmiten
los pares al interior de la cámara (70) tiene forma de anillos de sellado (16, 36) o sellos de eje radiales con labios de
sellado.
- 35 7. Dispositivo según las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dos mesas giratorias excéntricas, cuyos ejes se extienden
en el interior de la cámara desde arriba, mueven un dispensador montado en las mismas sobre las ubicaciones de
muestra en un soporte de muestra estacionario.

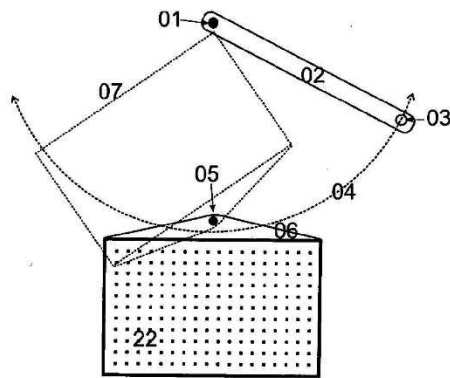


Figura 1

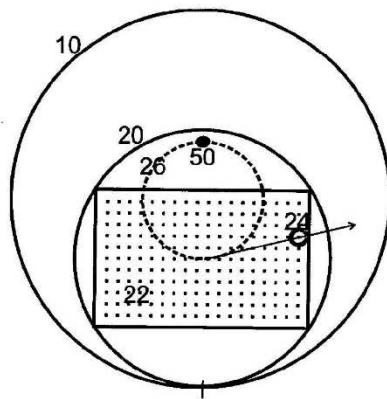


Figura 2

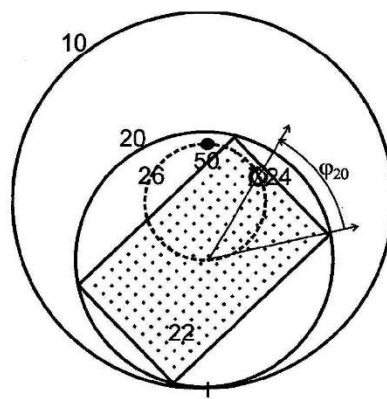


Figura 3

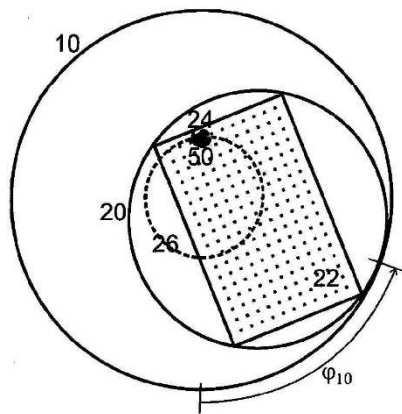


Figura 4

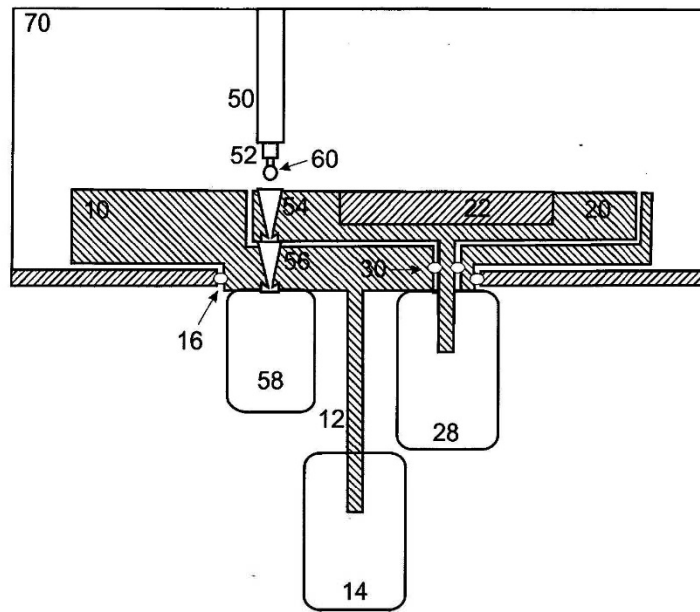


Figura 5

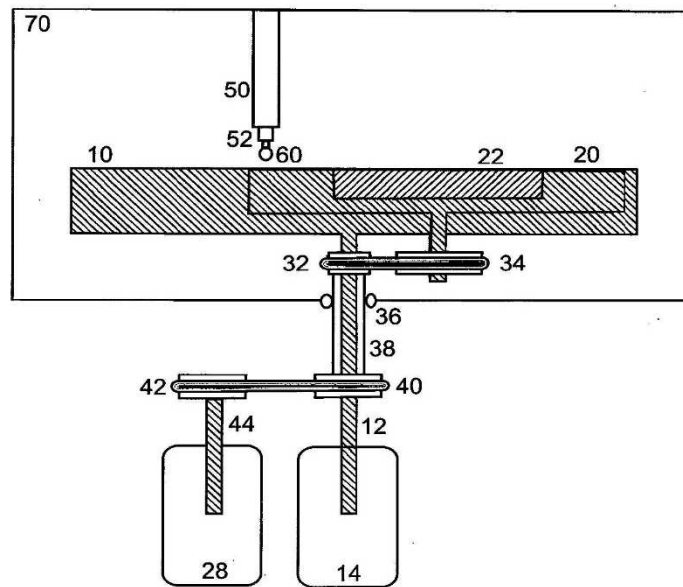


Figura 6