

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 955 671**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2017 PCT/EP2017/053470**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.08.2017 WO17144338**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2017 E 17708445 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2023 EP 3420339**

54 Título: **Herramienta de análisis automatizado para muestras de ensayo biológicas**

30 Prioridad:

**22.02.2016 US 201615049368**

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

**05.12.2023**

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC B.V. & CO. KG (100.0%)  
Friedrich-Ebert-Strasse 68  
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**KRIEG, JÜRGEN;  
MILTENYI, STEFAN;  
ROCKEL, THOMAS y  
IGNATIUS, SVEN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 955 671 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**

Herramienta de análisis automatizado para muestras de ensayo biológicas

**Antecedentes**

La presente invención se refiere a una herramienta y un método para analizar muestras de ensayo biológicas.

- 5 Los tintes fluorescentes conjugados con uno o más anticuerpos se utilizan habitualmente para análisis de inmunofluorescencia. En las últimas dos décadas se ha desarrollado un gran número de variantes en términos de anticuerpos, tintes fluorescentes, citómetros de flujo, clasificadores de flujo y microscopios de fluorescencia, con el fin de permitir la detección y aislamiento específicos de células diana.
- 10 Los conjugados de fluorocromo dirigidos al antígeno de interés se utilizan para detectar y formar imágenes de estructuras celulares de tejidos. En estas técnicas, la eliminación secuencial de la señal de fluorescencia y la re-tinción permiten un mayor potencial de transmisión simultánea en comparación con los procedimientos convencionales que utilizan etiquetado y detección de forma simultánea. Por ejemplo, el documento US 7741045 B2 o DE10143757 divulgan la eliminación de la señal de fluorescencia mediante destrucción foto- o química de restos fluorescentes conjugados.
- 15 En las técnicas anteriormente mencionadas, las señales de fluorescencia resultantes se recogen en forma de una imagen. Mediante la eliminación secuencial de la señal de fluorescencia y la re-tinción con diferentes conjugados de fluorocromo, se detectan diferentes antígenos, lo que tiene como resultado una pluralidad de imágenes de la misma muestra de ensayo que muestran diferentes partes (antígenos) de la muestra. La calidad de la información recopilada con estas técnicas depende en gran medida de la resolución de las imágenes, precisión de las etapas de manipulación
- 20 y tiempo requerido entre las etapas durante los cuales se manipula la muestra. Las técnicas conocidas permiten un número muy limitado de imágenes de una muestra biológica particular a través de una serie de tinciones, debido a las laboriosas etapas de manipulación. Por consiguiente, se demanda un procedimiento automatizado para ciclos de tinción, formación de imágenes y eliminación de la tinción de muestras de ensayo biológicas con fines de análisis.

**Sumario**

- 25 Aquí se describe un sistema que permite el análisis secuencial de una muestra biológica in situ, bajo control informático. El dispositivo permite la aplicación secuencial de un gran número de reactivos fluorescentes a una misma muestra biológica, y la observación de la muestra a través de un soporte transparente mediante un mecanismo de formación de imágenes. El mecanismo de formación de imágenes puede ser un sistema de formación de imágenes por fluorescencia que, en combinación con un ordenador de recogida de datos, puede formar una imagen visual de la
- 30 muestra biológica teñida con una serie de diversos reactivos. Entre cada uno de los reactivos, la fluorescencia se puede inactivar mediante un segundo sistema óptico dispuesto lateralmente en posición adyacente al sistema de formación de imágenes de fluorescencia, que irradia la muestra con suficiente luz para desactivar o destruir el resto fluorescente.
- 35 Por consiguiente, el sistema puede incluir una pluralidad de muestras y una pluralidad de reactivos, cada uno presente en un pocillo separado de una placa de microvaloración. Se puede incluir un sistema automatizado de manipulación de fluidos, en el que una pipeta controlada robóticamente recupera una cantidad de un reactivo particular a partir de un pluralidad de recipientes de reactivo y deposita esa cantidad en un pocillo de muestra particular que contiene la muestra biológica particular.
- 40 La pluralidad de pocillos de microvaloración puede estar suministrada por una placa de microvaloración desechable de plástico, con pequeños pocillos de fluido formados en la misma. Cada uno de los pocillos puede contener diferentes compuestos, tales como reactivos, restos de reconocimiento de antígeno que tienen restos de detección, tales como anticuerpos con tintes fluorescentes, antibióticos, nutrientes biológicos, toxinas, colorantes y oxidantes. De manera alternativa, el producto desechable puede comprender una pluralidad de áreas segmentadas y funcionalizadas en las que se fija una estructura biológicamente activa.
- 45 Se conoce un sistema automatizado según el preámbulo de la reivindicación independiente 1 adjunta a partir de los documentos US 2013/165330 A1, WO 2014/138197 A1 o EP 0 810 428 B1.
- Por consiguiente, el objeto de la invención es un sistema automatizado para analizar muestras biológicas teñidas con al menos un tinte fluorescente, que comprende:
- 50 – un sistema de fluorescencia que comprende una unidad de excitación y una unidad de detección de señales de fluorescencia obtenidas a partir del tinte fluorescente;
- una abertura para albergar al menos un recipiente que contiene al menos una muestra biológica con el tinte fluorescente;
- una unidad de inactivación que inactiva la señal de fluorescencia;

- una manipulación de fluido que suministra y/o retira fluidos del interior y/o desde el recipiente;
- un mecanismo que mueve al menos uno de la abertura, el sistema de fluorescencia, la unidad de inactivación y el sistema de manipulación de fluidos en al menos dos dimensiones ortogonales que definen un plano de trabajo; y
- y una unidad de control que ejecuta una rutina que incluye la excitación del tinte fluorescente, detección y recogida de señales de fluorescencia e inactivación de las señales de fluorescencia de forma automatizada, que se caracteriza porque la unidad de inactivación comprende una fuente de luz dispuesta lateralmente en posición adyacente al sistema de fluorescencia y que emite radiación de inactivación y en el que la unidad de inactivación comprende más de una fuente de luz que emite radiación de inactivación de diferentes longitudes de onda.

### Breve descripción de los dibujos

- 10 Se describen diversos detalles a modo de ejemplo con referencia a las siguientes figuras, en las que:
- La Figura 1 es una vista en planta simplificada de la herramienta de análisis automatizado;
- La Figura 2 es una vista lateral simplificada de la herramienta de análisis automatizado con un soporte de muestra desechable dispuesto en su interior;
- 15 La Figura 3 es una vista lateral simplificada de la herramienta de análisis automatizado que muestra un sistema automatizado de toma de muestra con pipeta;
- La Figura 4 es una vista lateral simplificada de un sistema de formación de imágenes de fluorescencia;
- La Figura 5 es una vista lateral simplificada de un sistema de inactivación óptica con control de retroalimentación;
- La Figura 6 es una vista lateral simplificada de un sistema de inactivación óptica con fuente de láser y espejo resonador;
- 20 La Figura 7 es una vista lateral simplificada de una realización de un sistema de inactivación óptica con múltiples pasadas a través de la muestra biológica;
- La Figura 8 es una vista lateral simplificada de otra realización de un sistema de inactivación óptica con múltiples pasadas a través de la muestra biológica;
- 25 La Figura 9 es una vista lateral simplificada de otra realización de un sistema de inactivación óptica con múltiples pasadas a través de la muestra biológica; y
- La Figura 10 es un diagrama de flujo simplificado que muestra un método para utilizar la herramienta automatizada para muestras de ensayo biológicas.
- Se debe entender que los dibujos no están necesariamente a escala y que números similares pueden hacer referencia a características similares.

### 30 Descripción detallada

El sistema y método de la invención están diseñados para analizar una pluralidad de muestras biológicas con una pluralidad de reactivos fluorescentes de forma automatizada. En el sistema, un sistema de toma de muestra con pipeta de control robótico puede recuperar una cantidad de un reactivo fluorescente de uno de una pluralidad de recipientes de fluido, cada uno de los cuales contiene un reactivo diferente. El sistema de toma de muestra con pipeta de control robótico puede a continuación suministrar esa cantidad de reactivo a uno específico de una pluralidad de pocillos de fluido que contienen muestra. Los pocillos de muestra de fluido también pueden contener un fluido tampón, así como la muestra biológica. La pluralidad de reactivos se puede almacenar en los recipientes de reactivo de una placa de microvaloración 90, mientras que la pluralidad de muestras se puede almacenar en los pocillos de muestra de la placa de microvaloración 92. Por consiguiente, como se usa en la presente memoria, el número de referencia 90 hace referencia a una placa de microvaloración desechable que almacena reactivos en recipientes, y el número de referencia 92 designa una placa de microvaloración desechable que almacena muestras biológicas separadas en pocillos.

#### Reactivos fluorescentes

45 Los reactivos fluorescentes usados en la presente invención comprenden un resto fluorescente y un resto que reconoce antígenos, opcionalmente conectados por una molécula espaciadora.

Los restos fluorescentes apropiados son los conocidos en la técnica de tecnologías de inmunofluorescencia, por ejemplo, citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. Los restos fluorescentes útiles podrían estar basados en proteínas, tales como ficobiliproteínas, sustancias poliméricas, tales como polifluorenos, tintes de moléculas orgánicas pequeñas, tales como xantenos, tales como fluoresceína, o rodaminas, cianinas, oxazinas, cumarinas, acridinas,

oxadiazoles, pirenos, pirometenos o compuestos metalo-orgánicos, tales como complejos Ru, Eu, Pt. Además de entidades de molécula individual, también se pueden utilizar como restos fluorescentes asociaciones de proteínas fluorescentes o tintes de moléculas orgánicas pequeñas, tales como nanopartículas, tales como de puntos cuánticos, nanopartículas de conversión ascendente, nanopartículas de oro y nanopartículas poliméricas teñidas.

5 En otra variante de la invención, los reactivos de fluorescencia comprenden un espaciador susceptible de degradación enzimática que separa el resto fluorescente y el resto de reconocimiento de antígeno. Para eliminar la emisión de fluorescencia, la unidad de inactivación puede proporcionar enzimas apropiadas que degraden el espaciador, liberando así el resto fluorescente del resto de reconocimiento de antígeno, es decir, de la muestra biológica. El tinte liberado se puede eliminar de la muestra mediante lavado. En la solicitud de patente EP15200338.0 se describen  
10 enzimas y reactivos de fluorescencia adecuados e incluyen, por ejemplo, polisacáridos, proteínas, péptidos, decapeptidos, poliésteres, ácidos nucleicos, dextranos, pululanos, inulinas, amilosa, celulosa, hemicelulosas, xilano, glucomanano, pectina, quitosano o quitina como espaciador enzimático e hidrolasas, liasas o reductasas como enzima.

15 El resto fluorescente se puede acoplar de forma covalente o no covalente al resto de reconocimiento de antígeno, a través de un espaciador opcional. Los expertos en la técnica conocen métodos para la conjugación covalente o no covalente. En caso de enlace covalente entre el resto fluorescente, el resto de reconocimiento de antígeno o el espaciador opcional, reacción directa de un grupo activado sobre uno del resto fluorescente, se puede usar el resto de reconocimiento de antígeno o el espaciador con grupo funcional en las otras unidades respectivas.

#### Resto de reconocimiento de antígeno

20 La expresión "resto de reconocimiento de antígeno" hace referencia a cualquier tipo de anticuerpo o anticuerpo fragmentado o derivados de anticuerpo fragmentado, dirigidos contra marcadores expresados en las células de la muestra celular. La expresión hace referencia a anticuerpos completamente intactos, anticuerpos fragmentados o derivados de anticuerpo fragmentado, por ejemplo, Fab, Fab<sub>2</sub>, F(ab<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, sdAb, scFv, di-scFv, nanocuerpos. Dichos derivados de anticuerpo fragmentado se pueden sintetizar mediante procedimientos recombinantes que incluyen  
25 conjugados covalentes y no covalentes que contienen este tipo de moléculas. Otros ejemplos de restos de reconocimiento de antígeno son complejos de péptido/MHC que se dirigen a moléculas de TCR, moléculas receptoras de adhesión celular, receptores para moléculas co-estimulantes, moléculas de unión diseñadas artificialmente, por ejemplo, péptidos o aptámeros que se dirigen, por ejemplo, a moléculas de la superficie celular.

30 Los reactivos fluorescentes usados en el método de la invención pueden comprender hasta 100, preferentemente 1-20 restos de reconocimiento de antígeno y/o restos de detección.

Preferentemente, los reactivos fluorescentes usados en la presente invención comprenden un resto fluorescente y un anticuerpo dirigido contra el antígeno expresado por las muestras de ensayo biológicas (células diana) intracelulares, tales como IL2, FoxP3, CD154, o extracelulares, tales como CD3, CD14, CD4, CD8, CD25, CD34, CD56 y CD133.

#### Muestras biológicas

35 Las muestras biológicas comprenden restos diana que se pueden detectar/reconocer por medio de los restos de reconocimiento de antígeno de los reactivos fluorescentes. Las muestras biológicas pueden provenir de cualquier muestra de ensayo, tales como animales completos, órganos, cortes tisulares, agregados de células o células individuales de invertebrados (por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*), vertebrados (por  
40 ejemplo, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*) y mamíferos (por ejemplo, *Mus musculus*, *Homo sapiens*). La muestra biológica puede adoptar la forma de corte tisular, agregado celular, células en suspensión o células adherentes. Las células pueden estar vivas o muertas. Cada uno de estos reactivos puede estar presente en un recipiente de fluido separado, de modo que cada recipiente de fluido contenga al menos uno de los reactivos, restos de reconocimiento de antígeno que tienen restos de detección, anticuerpos con tintes fluorescentes, antibióticos, nutrientes biológicos, toxinas, colorantes y oxidantes.

45 Cada uno de los reactivos se puede recuperar por medio del sistema de manipulación de fluidos y aplicado a la muestra biológica de la que el sistema genera las imágenes, como se describe más adelante.

#### Sistema de fluorescencia

50 La excitación de fluorescencia se lleva a cabo mediante irradiación de luz de longitud de onda adecuada ajustada al reactivo de fluorescencia, tal como luz verde de 520-560 nm para la excitación de R-ficoeritrina (R-PE). Por tanto, la unidad de excitación proporciona radiación electromagnética en el intervalo espectral que absorbe el fluoróforo específico. A continuación, el fluoróforo emite luz fluorescente de longitud de onda desplazada al rojo (los desplazamientos suelen ser de alrededor de 20 nm) que se puede detectar por separado de la radiación de excitación. Las implementaciones típicas de unidades de excitación de microscopio de fluorescencia albergan una fuente de luz blanca, tal como lámparas de arco, lámparas de xenón o halogenuros metálicos, y filtros sucesivos para generar la  
55 banda espectral requerida para la excitación. También se utilizan láseres o diodos emisores de luz.

## Unidad de inactivación

Los términos "inactivación" y "blanqueo" se usan indistintamente en la presente memoria, y se debe entender que significan la disminución de fluorescencia de una muestra biológica marcada, como resultado de la alteración química o radiativa del fluoróforo o su unión a la muestra biológica marcada. Por consiguiente, el sistema de inactivación puede comprender además una fuente de al menos uno de una sustancia química o radiación que altera la capacidad de fluorescencia del reactivo o su unión a la muestra biológica.

La unidad de inactivación puede proporcionar una irradiación de alta intensidad de la muestra usando luz de una longitud de onda que es absorbida por el fluoróforo específico. Para muchos tintes de uso común, es suficiente una combinación de LED generadores de color azul (450 - 500 nm), verde (520 - 560 nm) y rojo (630 - 650 nm). Una mayor intensidad de radiación reduce el tiempo necesario para la inactivación. Usando aproximadamente 300 mW/cm<sup>2</sup> para R-PE, se obtiene una vida media de caída exponencial de la señal de fluorescencia de aproximadamente 30 segundos. Por tanto, se necesitan aproximadamente tres minutos para reducir la señal de fluorescencia a un 1 - 5 % de la señal inicial. Esto se puede hacer simultáneamente para diferentes fluoróforos, por ejemplo FITC (excitación 470 nm, emisión 520 nm), R-PE (ex 530 nm, em 580 nm), APC (ex 630 nm, em 660 nm). En la presente realización, la unidad de inactivación también puede ser el mismo componente que la unidad de excitación.

Por consiguiente, la unidad de inactivación está provista de más fuentes de luz que emiten radiación de inactivación de diferentes longitudes de onda. Por ejemplo, la unidad de inactivación puede estar provista de 2-5 fuentes de luz que tienen un espectro de emisión combinado en el intervalo de 350-850 nm, preferentemente de 450-650 nm. La emisión de las fuentes de luz se puede combinar ópticamente para irradiar la muestra de forma simultánea o posterior. Por ejemplo, la unidad de inactivación puede estar provista de tres fuentes de luz que emiten en los intervalos de 450-500 nm (azul), 520 - 560 nm (verde) y 630 - 650 nm (rojo). En otra realización sólo se proporciona una fuente de luz, que emite luz en el intervalo de 350 - 850 nm, preferentemente 450 - 650 nm. La ventaja de fuentes de luz separadas es que la muestra se expone únicamente a la radiación necesaria para inactivar (eliminar) el tinte fluorescente, evitando de este modo la exposición innecesaria de la muestra a radiación con otras longitudes de onda. La radiación de las fuentes de luz separadas se puede combinar mediante dispositivos apropiados tales como espejos o guías de ondas ópticas tales como fibra óptica.

En una realización preferida, la unidad de inactivación puede incluir un detector de fluorescencia que controla la caída de la señal de fluorescencia en forma de datos de inactivación. La unidad de inactivación puede comprender un detector de fluorescencia para todas las fuentes de luz o detectores de fluorescencia para cada fuente de luz por separado. Una unidad de control puede controlar cada fuente de luz en la unidad de inactivación con uno o más bucles de retroalimentación basados en los datos de inactivación respectivos. Por motivos de conveniencia, la eliminación de fluorescencia se puede medir en la longitud de onda de la emisión más alta, pero también resulta adecuado calcular la integral de los espectros de emisión entre dos longitudes de onda. En esta variante de la invención, la unidad de control y/o unidad de inactivación están configuradas de manera que cuando la emisión de fluorescencia no se elimina mediante inactivación por debajo de un umbral predefinido, se repite el proceso de inactivación. Por ejemplo, se considera que se logra inactivación de la emisión de fluorescencia cuando ésta se reduce a menos de un 5 %, preferentemente menos de un 1 %, de la emisión de fluorescencia inicial. En la variante de proporcionar simultáneamente más de un reactivo fluorescente, la reducción de la emisión de fluorescencia se basa en cada una de las emisiones de fluorescencia medidas.

La unidad de inactivación puede estar provista además de medios para homogeneizar la radiación y/o intensidad de radiación por área superficial de la muestra. El blanqueo no homogéneo tiene como resultado que determinadas zonas estén menos irradiadas, es decir, menos blanqueadas que otras. Dichas áreas menos blanqueadas son visibles/detectables en la imagen final de la muestra o requieren irradiación adicional para el blanqueo, lo que requiere mucho tiempo y/o podría conducir a daños en las áreas ya blanqueadas de la muestra. En una primera realización, la unidad de inactivación está provista de un medio difusor para dispersar la luz de la unidad de inactivación. Mediante la dispersión de luz se elimina cualquier distribución no homogénea de la radiación por área superficial que pudiera conducir a un blanqueo no homogéneo. Como materiales difusores se pueden utilizar vidrio esmerilado, teflón, elementos holográficos, vidrio opalino o vidrio grisáceo.

En otra realización para homogeneizar la radiación y/o la intensidad de radiación, la unidad de inactivación o el soporte de muestra o la plataforma móvil 10 pueden estar provistos de un medio de vibración, es decir, se ponen en un ligero movimiento de vaivén en una o dos dimensiones del plano de trabajo, por ejemplo en un intervalo de como máximo +-1 mm.

En caso de que la unidad de inactivación comprenda fuentes de luz que irradian un área más pequeña que el tamaño de muestra, además resulta posible mover la unidad de inactivación y/o la plataforma móvil 10 en el plano de trabajo x-y dentro del área de soporte de muestra o dentro del área superficial de la muestra. Preferentemente, la unidad de inactivación rápida y/o la plataforma móvil 10 se mueven en líneas, círculos o en forma de rejilla en el plano de trabajo x-y dentro del área de la muestra. Es preferible que el movimiento sea bajo el control de un microprocesador.

En otra realización más de la invención, la unidad de inactivación y/o las fuentes de luz están provistas de un filtro óptico que protege la muestra de cualquier radiación que tenga una longitud de onda no adecuada para la inactivación, pero sí para inducir calor en la muestra. Preferentemente, el filtro óptico elimina sustancialmente toda la radiación que tenga una longitud de onda menor que 400 nm y/o mayor que 900 nm de la luz utilizada para la inactivación. Esta realización tiene la ventaja de que la muestra se expone únicamente a la radiación necesaria para inactivar (eliminar) el tinte fluorescente y al mismo tiempo eliminar la radiación IR que, de otro modo, podría aumentar de manera indeseable la temperatura de la muestra.

En otra variante de la invención, la unidad de inactivación proporciona sustancias químicas que eliminan el tinte fluorescente, por ejemplo mediante blanqueo oxidativo. Los productos químicos necesarios para el blanqueo se conocen a partir de las publicaciones anteriormente mencionadas sobre tecnologías "Multi Epitope Ligand Cartography", "Chip-based Cytometry" o "Multiomx".

#### Portamuestras desechable

El recipiente del sistema automatizado de la invención puede comprender una pluralidad de pocillos de fluido, conteniendo cada uno de ellos una muestra biológica separada. Preferentemente, el recipiente es una placa de valoración.

Como se usan en la presente memoria, las expresiones "placa de valoración", "placa de valoración de pocillos múltiples" y "placa de microvaloración" se usan indistintamente, y ambos se deben entender como una estructura que contiene una pluralidad de pocillos pequeños o depresión, cada uno de los cuales se puede usar para contener un líquido o muestra de ensayo, separada de los demás pozos o depresiones. Ambos se refieren especialmente a dispositivos según ANSI SBS 1-2004.

La Figura 2 es una vista en planta de la herramienta de análisis automatizado para muestras 1 de ensayo biológicas, con soportes 90 y 92 de muestra desechables e instalados en las aberturas 20 y 22. Como se ha mencionado anteriormente, en la descripción siguiente, la placa de microvaloración 90 puede contener los reactivos y la placa de microvaloración 92 puede contener las muestras. Los soportes 90 y 92 de muestra desechables pueden ser una estructura plástica rígida de dimensiones conocidas en la que se puede formar una pluralidad de pocillos de fluido. De hecho, los desechables 90 y 92 pueden ser ambos placas de valoración de pocillos múltiples que tienen un factor de forma convencional, por ejemplo, con 96 pequeños pocillos de fluido formados en las mismas.

Los desechables 90 y 92 pueden ser, alternativamente, portaobjetos de vidrio sobre los que se inmoviliza la muestra biológica. En otras realizaciones, los desechables 90 y 92 pueden incluir superficies funcionalizadas en regiones distintas y separadas sobre un soporte transparente tal como plástico. El soporte puede ser un portaobjetos de vidrio, o cualquier otra superficie transparente que pueda contener la muestra biológica y sea susceptible de formación de imágenes por medio del sistema 30 de formación de imágenes de fluorescencia y/o sistema 40 de inactivación de fluorescencia. El desechable puede comprender además partes transparentes y no transparentes en las que se coloca la muestra biológica sobre la parte transparente, y las partes no transparentes reflejan o absorben la luz. Por consiguiente, la muestra biológica puede estar ubicada en la parte transparente y las partes no transparentes pueden reflejar o absorber las señales de fluorescencia.

El material de los desechables 90 y 92 puede estar seleccionado o puede estar revestido para reducir la absorción de luz. Se pueden elegir materiales opacos u ópticamente absorbentes o se pueden revestir materiales transparentes con películas reflectantes usando, por ejemplo, CVD (deposición química de vapor) de metales o TiO<sub>2</sub> (reflexión más que absorción).

#### Sistema automatizado

El sistema de la invención puede incluir un sistema de fluorescencia que mide una señal de fluorescencia, una abertura para albergar un desechable que contiene al menos una muestra biológica sobre el sistema de fluorescencia, un sistema de inactivación que proporciona luz de inactivación para inactivar la señal de fluorescencia procedente de la muestra biológica, un sistema de manipulación de fluido que puede suministrar y/o retirar fluido dentro y/o desde el recipiente, un mecanismo para mover al menos uno de la abertura, el sistema de fluorescencia, la unidad de inactivación y el sistema de manipulación de fluido en al menos dos dimensiones ortogonales que definen un plano de trabajo, y una unidad de control que ejecuta una rutina que incluye la excitación del tinte fluorescente, detección y recopilación de señales de fluorescencia e inactivación de señales de fluorescencia de forma automatizada.

Como se divulga más adelante, la unidad de control recoge las señales de fluorescencia en forma de imágenes de la muestra biológica teñida con un tinte fluorescente.

El sistema de manipulación de fluidos puede ser un sistema capaz de transferir fluidos entre receptáculos de fluidos. El sistema de manipulación de fluidos puede incluir una pluralidad de recipientes para fluido que albergan una pluralidad de reactivos y una fuente de presión neumática o vacío, de modo que los fluidos se puedan retirar de al menos un recipiente y se puedan insertar en otro.

El sistema de manipulación de fluidos puede proporcionar al menos uno de tintes fluorescentes, compuestos que inactivan las señales de fluorescencia, fluidos de lavado y tampón a la muestra biológica. Preferentemente, el sistema de manipulación de fluidos comprende un sistema de pipeta controlado robóticamente dispuesto en una etapa, en el que el sistema de toma de muestra con pipeta se puede mover a lo largo del eje z ortogonal al plano de trabajo.

5 Se debe entender, no obstante, que las realizaciones de la invención pueden incluir sistemas en los que la muestra se puede mover con respecto a los sistemas ópticos 30 y 40, así como realizaciones en las que los sistemas ópticos 30 y 40 se pueden mover con respecto a las muestras. Para mayor claridad de explicación, la invención se describe con respecto a una realización representada en las Figuras 1 - 9, en las que las muestras se mueven sobre una  
10 plataforma móvil 10, con respecto al sistema 30 de formación de imágenes y al sistema de inactivación 40. Se debe entender que también se prevén realizaciones alternativas, en las que, por ejemplo, los sistemas ópticos se mueven con respecto a las muestras biológicas. Por consiguiente, el aparato puede incluir un mecanismo para mover al menos uno de la abertura y el sistema de fluorescencia en al menos dos dimensiones ortogonales para formar las imágenes de las muestras biológicas.

15 La Figura 1 es una vista en planta de una realización de una herramienta de análisis automatizado para muestras de ensayo biológicas, 1. En la herramienta se incluye una plataforma móvil 10 en la que se forman dos aberturas 20 y 22. La plataforma móvil 10 puede estar formada por cualquier material rígido que sea ligero y fácil de mecanizar, tal como por ejemplo aluminio. En la figura 1 no se muestra una pluralidad de motores, tales como motores que operan paso a paso, por ejemplo, que ajustan el posicionamiento de la plataforma móvil 10 en las dos direcciones ortogonales mostradas. Estas dos direcciones ortogonales, denominadas dirección X y dirección Y en la Figura 1, definen un plano  
20 x-y móvil para la herramienta 1 de análisis automatizado. Este plano se denomina en la presente memoria plano de trabajo. La plataforma móvil 10 se puede mover en el plano de trabajo x-y bajo el control de un microprocesador, unidad de control u ordenador 110. El ordenador o unidad de control 110, puede mover la abertura 20 o 22 en el plano de trabajo con una precisión de +/- aproximadamente de 1 a 200 micrómetros en la dirección x o y, dependiendo de la velocidad y precisión requeridas.

25 También se muestra en la Figura 1 una unidad de refrigeración, 50, que proporciona refrigeración a la muestra de ensayo biológica, el tampón, así como al material de la propia plataforma móvil 10. Por consiguiente, el sistema puede comprender además una unidad de enfriamiento que enfríe el plano de trabajo e incluya la muestra biológica. También se muestra en la Figura 1 un recinto refrigerado como una caja aislada o tienda de campaña, 60, que se puede colocar sobre las dos aberturas 20 y 22, así como la unidad de refrigeración, 50. El recinto refrigerado se puede conformar  
30 como tienda de campaña de cualquier material mínimamente poroso y flexible, tal como un mylar transparente. El recinto se puede colocar sobre las aberturas 20 y 22, para mantener el frío en el ambiente alrededor de la muestra biológica, como se describe a continuación. Por consiguiente, el sistema automatizado puede comprender además una unidad de control de temperatura que controla la temperatura de la muestra biológica hasta un punto establecido entre aproximadamente 10-40 °C.

35 Directamente debajo de las aberturas 20, 22 puede haber dos sistemas ópticos, 30 y 40. Estos dos sistemas ópticos pueden ser, respectivamente, un sistema 30 de formación de imágenes por fluorescencia y un sistema 40 de blanqueo de fluorescencia. Los detalles de estos dos sistemas ópticos, el sistema 30 de formación de imágenes de fluorescencia y el sistema 40 de blanqueo de fluorescencia se describen de forma adicional a continuación. Los sistemas ópticos 30 y 40 se asientan generalmente debajo de al menos una de las aberturas 20 o 22. A efectos de ilustración, estas  
40 aberturas están vacías en la Figura 1, pero cuando la herramienta de análisis se encuentra en funcionamiento, las aberturas 20 y 22 pueden albergar muestras de ensayo biológicas (en 22) y una colección de reactivos (en 20), o viceversa, como se describe a continuación. En la Figura 1 no se muestran las estructuras adicionales requeridas para el sistema 30 de formación de imágenes ópticas o el sistema 40 de blanqueo de fluorescencia. Estas estructuras adicionales pueden incluir lentes, espejos, detectores, fuentes y otros componentes ópticos adicionales. Estas estructuras adicionales se analizan de forma adicional a continuación.

45 Cabe señalar que el sistema 30 de formación de imágenes por fluorescencia puede estar dispuesto directamente en posición adyacente al sistema 40 de blanqueo por fluorescencia.

50 En la Figura 1 no se muestran los motores que operan paso a paso, engranajes, cojinetes y otras piezas mecánicas utilizadas para lograr un movimiento repetible y preciso de la plataforma móvil 10 en el plano x-y. Dichos componentes se encuentran fácilmente disponibles y las dimensiones apropiadas y otras características mecánicas dependen de los detalles de aplicación. Tampoco se muestran diversos mecanismos de amortiguación, tales como resortes, amortiguadores y topes de goma. Dichos componentes se pueden usar para aislar la herramienta 1 de análisis automatizado de factores ambientales tales como golpes y vibraciones.

55 La plataforma móvil 10 se puede mover para ajustar el posicionamiento preciso de un único pocillo de desechable 92 o 92 con respecto a los otros componentes. Por ejemplo, el desechable 92 se puede ubicar directamente encima del sistema 30 de formación de imágenes de fluorescencia y/o sistema 40 de inactivación de fluorescencia, durante la manipulación de muestra. En otras ocasiones, el desechable 90 se puede ubicar directamente debajo de un sistema de manipulación de líquidos, mostrado como pipeta 70 durante la recuperación de reactivo, como se describe a continuación con respecto a la Figura 3. Durante la manipulación de la muestra, la plataforma móvil se puede mover  
60 para ubicar una muestra particular muy por encima del aparato óptico, ya sea por encima del sistema 30 de formación

de imágenes de fluorescencia o por encima del sistema 40 de inactivación de fluorescencia. De hecho, el desechable 92 se puede colocar de manera que se pueda formar con precisión una imagen microscópica del contenido de cualesquiera de los pocillos en la placa 90 o 92 de valoración de pocillos múltiples.

5 De manera similar a la Figura 1, la unidad de refrigeración 50 puede enfriar las placas 90 y 92 de valoración de pocillos múltiples, así como los fluidos contenidos en ellas. Un recinto sustancialmente no poroso tal como una tienda de campaña 60 puede restringir el movimiento de aire al interior del entorno circundante, contribuyendo así a mantener fría la muestra biológica en las placas 90 o 92 de valoración de pocillos múltiples.

10 La Figura 3 es una vista lateral que muestra la plataforma móvil 10 y una pipeta manipulable 70 sostenida directamente encima de la placa 90 de valoración de pocillos múltiples. La pipeta 70 se puede sujetar y controlar mediante el controlador de posición, la plataforma de pipeta 80, y se puede mover bajo la dirección de un microprocesador u ordenador. La plataforma de pipeta 80 puede mover la pipeta 70 en la dirección Z hacia cualquiera de una pluralidad de pocillos de valoración de la placa de microvaloración 90. Cada uno de la pluralidad de pocillos puede contener diferentes compuestos y puede incluir al menos uno de reactivos, restos de reconocimiento de antígeno que tienen restos de detección, anticuerpos con tintes fluorescentes, antibióticos, nutrientes biológicos, toxinas, colorantes, oxidantes.

15 Por tanto, la pipeta 70 puede ser un sistema de pipeta controlado robóticamente dispuesto en una plataforma, en el que el sistema de toma de muestra con pipeta se puede mover a lo largo de un eje z ortogonal al plano de trabajo y está configurado para aplicar diferentes compuestos a la muestra biológica.

20 En otra realización de la invención, el sistema de manipulación comprende un medio para limpiar el exterior del sistema de pipetas de fluidos adheridos. El sistema de limpieza elimina todas las sustancias adheridas a la pipeta (70) para evitar la contaminación cruzada entre muestras. Para ello se debe limpiar al menos la parte de la pipeta que está en contacto con líquidos o muestras y/o que se inserta en el recipiente de muestra. En una primera variante de la presente realización, la limpieza de la superficie exterior de la pipeta 70 de los fluidos adheridos se puede lograr mediante una pastilla limpiadora o líquido limpiador. Con esta finalidad, la plataforma de pipeta 80 puede estar provista de al menos una pastilla limpiadora que elimina el material de la pipeta 70. La pastilla limpiadora puede estar formada por cualquier material adecuado para absorber líquidos, tal como algodón o papel tisú.

25 En una segunda variante de la presente realización, la limpieza de la pipeta 70 se logra mediante lavado de la superficie exterior de la pipeta 70 con un líquido limpiador. En la presente realización de la invención, la plataforma de pipeta 80 está provista de un manguito o guía para la pipeta 70 que se puede lavar con líquido limpiador proporcionado y retirado a través de al menos un orificio del manguito. Al guiar la pipeta 70 a través del manguito o guía, la pipeta 70 se mueve a través de un depósito de líquido limpiador o a través de una corriente de líquido limpiador, garantizando de este modo que la pipeta 70 sólo esté en contacto con líquido limpiador nuevo y no contaminado. Dicha plataforma de pipeta provista de un manguito se describe, por ejemplo, en el documento EP 2944373A1.

30 Debido a que la plataforma móvil 10 se puede mover en las direcciones X e Y, sólo es necesario el movimiento en la dirección Z para que la pipeta 70 recupere cualquiera de los reactivos presentes en cualquiera de los recipientes de la placa 90 de valoración de pocillos múltiples. Tras la recuperación de un reactivo particular, la plataforma móvil 10 se desplaza y se coloca de manera que el pocillo deseado o apropiado de la placa 90 de valoración de pocillos múltiples se ubique directamente debajo de la pipeta 70. A continuación, el tubo de 70 se baja al pocillo particular de la placa 90 de valoración de pocillos múltiples y el reactivo se deposita en el pocillo apropiado de la placa 90 de valoración de pocillos múltiples.

35 Por consiguiente, para teñir una muestra particular con un reactivo particular, la plataforma móvil 10 se puede mover para colocar el pocillo particular en la placa 90 de valoración de pocillos múltiples directamente debajo de la pipeta 70. A continuación, el controlador 80 baja la pipeta 70 al reactivo de fluido presente en el pocillo designado de la placa 90 de valoración de pocillos múltiples. La plataforma de pipeta 80 puede hacer que se aplique succión al cabezal de la pipeta 70, para extraer un volumen predeterminado de fluido presente en el pocillo de la placa de microvaloración 90. A continuación se retira la pipeta 70 del pocillo.

40 A continuación, el microprocesador 110 puede desplazar la plataforma móvil 10 a una posición en la que la muestra deseada o apropiada presente en un pocillo particular en la placa 92 de valoración de pocillos múltiples que se ubica directamente debajo de la pipeta 70. A continuación, el controlador 80 hace descender la pipeta 70 al interior del pocillo. Se aplica presión al cabezal de la pipeta 70 para expulsar los contenidos de la pipeta 70 al interior del pocillo designado de la placa 92 de microvaloración de pocillos múltiples que alberga la muestra de ensayo biológica. Posteriormente, es posible incubar la muestra de ensayo no teñida. Después de la incubación, se puede someter la muestra de ensayo biológica teñida a formación de imágenes como se describe a continuación.

45 La Figura 4 es una vista conceptual del sistema 30 de formación de imágenes de fluorescencia. La formación 30 de imágenes de fluorescencia puede incluir una fuente 32 de luz óptica, tal como una fuente de LED, que genera radiación en una banda de longitudes de onda. Esta radiación puede incidir sobre un espejo dicróico 38 que refleja la radiación en una lente objetivo 34. La lente objetivo 34 puede dar forma, enfocar o colimar la luz. A continuación, la radiación incide sobre un pocillo particular de la placa de microvaloración 92. El pocillo 92 de la placa de valoración de pocillos



múltiples puede incluir un fluido tampón 150 y una muestra 140 de ensayo biológica. Dependiendo de la naturaleza de la muestra 140 de ensayo biológica, se puede adherir al fondo del pocillo de la placa 92 de valoración de pocillos múltiples, o puede estar flotando o suspendida en el fluido tampón 150.

5 Si la muestra 140 de ensayo biológica es una célula, por ejemplo, se puede haber combinado con un colorante o reactivo. El colorante o reactivo puede ser un fluoróforo conjugado con un anticuerpo. El anticuerpo se puede unir a un marcador de superficie, o antígeno, que se encuentra en la membrana de la célula, y el fluoróforo puede emitir un fotón fluorescente tras la irradiación con luz de longitud de onda adecuada. Por consiguiente, la fuente de luz 32 puede emitir luz de esta longitud de onda para excitar el fluoróforo que posteriormente puede emitir un fotón fluorescente. El espejo dicróico 38 puede reflejar la radiación procedente de la fuente de luz sobre la muestra 140 de ensayo biológica  
10 marcada, pero el espejo dicróico 38 puede transmitir el fotón fluorescente al interior del detector 36 como se muestra en la Figura 4.

15 Por consiguiente, el espejo dicróico 38 se puede diseñar para reflejar luz en la longitud de onda de láser o la fuente óptica 32, pero para transmitir radiación en la longitud de onda de la fluorescencia emitida desde la muestra 140 de ensayo biológica. El detector óptico 36 puede ser cualquier detector digital pixelado, tal como por ejemplo una cámara CCD o una placa de microcanal. La lente objetivo 34 puede ser móvil o ajustable en el eje z, para enfocar el punto apropiado de la muestra 140 de ensayo biológica en el detector 36. La unidad de control xx puede recoger las señales de fluorescencia en forma de imágenes de la muestra biológica teñida con el tinte fluorescente.

20 La Figura 5 es una vista lateral conceptual del sistema 40 de inactivación de fluorescencia. El sistema 40 de inactivación de fluorescencia puede incluir una fuente óptica 42 que se enfoca mediante una lente objetivo 44 sobre la muestra 140 de ensayo biológica. Como antes, la muestra biológica puede estar sumergida en un fluido tampón 150 en un pocillo de la placa 92 de valoración de pocillos múltiples.

25 La fuente óptica 42 puede ser un LED o un láser, pero en cualquier caso la longitud de onda de la radiación emitida se elige para que se superponga a una banda de absorción del resto de fluorescencia o etiqueta fijada a la muestra 140 de ensayo biológica. Tras la aplicación de esta radiación, la muestra 140 de ensayo biológica con la etiqueta fijada puede tener la etiqueta fluorescente descompuesta, disociada, o destruida a causa de la radiación. Por consiguiente, el sistema de inactivación 40 puede comprender un sistema de inactivación óptica, que destruye la fluorescencia del reactivo mediante iluminación, y comprende una fuente de luz LED y una lente objetivo.

30 En cualquier caso, la etiqueta fluorescente fijada a la muestra biológica 140 puede dejar de experimentar fluorescencia de manera total o parcial. Como resultado de ello, la fluorescencia emitida por la muestra 140 de ensayo biológica en la placa 92 de valoración de pocillos múltiples disminuye. Esta fluorescencia reducida puede ser detectada por otro detector óptico 46 cuya salida está acoplada a un ordenador 48.

El ordenador 48 puede generar una señal que controla la amplitud de la fuente de radiación 42. El detector óptico 46 puede ser del mismo tipo, o de tipo diferente, que el detector óptico 36. Por consiguiente, el detector óptico 46 puede ser cualquier detector digital pixelado, tal como una cámara CCD o placa de microcanal.

35 Por consiguiente, el sistema de inactivación puede incluir un detector de fluorescencia que controla la caída de señal de fluorescencia del reactivo mediante iluminación, en forma de datos de inactivación. La unidad de control puede controlar el sistema de inactivación con un bucle de retroalimentación basado en los datos de inactivación. Por consiguiente, la unidad de control puede dirigir el sistema de inactivación para que continúe aplicando la radiación de inactivación hasta que se alcance un umbral fluorescente predefinido.

40 Al detectar fluorescencia continua procedente de la muestra 140 de ensayo biológica, medida por el detector 46, el ordenador 48 aumenta o da continuidad a la corriente aplicada a la fuente 42 de luz óptica, con el fin de aumentar o dar continuidad a la cantidad de radiación aplicada a la muestra 140 de ensayo biológica. Sólo cuando toda la radiación fluorescente deja de emitirse desde la muestra 140 de ensayo biológica o cae por debajo de determinado valor umbral predeterminado, el ordenador 48 puede interrumpir la señal de activación a la fuente 42 de luz óptica. Por ejemplo, la  
45 eliminación de fluorescencia se puede medir en la longitud de onda de la muestra de ensayo biológica, emisión más alta, pero también resulta apropiado calcular la integral de los espectros de emisión. En esta variante de la invención, la unidad de control y/o unidad de inactivación están configuradas de manera que cuando la emisión de fluorescencia no se elimina mediante inactivación por debajo de un umbral predefinido, se repite el proceso de inactivación, por ejemplo, es posible medir la eliminación de fluorescencia en la longitud de onda de la emisión más elevada, pero  
50 calculando la integral del espectro de emisión también resulta posible. En esta variante de la invención, la unidad de control y/o unidad de inactivación está configurada de tal manera que cuando no se elimina la emisión de fluorescencia por medio de inactivación por debajo de un valor umbral predefinido, se repite el proceso de inactivación. Por ejemplo, se considera que se ha logrado inactivación de la emisión de fluorescencia cuando ésta se reduce a menos de un 5 %, preferentemente menos de un 1 % de la emisión de fluorescencia de partida. Por consiguiente, en algunas  
55 realizaciones, el sistema 40 de inactivación de fluorescencia puede tener un mecanismo de retroalimentación controlado por ordenador, que determina cuando es posible hacer que el proceso de inactivación de iluminación de la muestra biológica 140 entre en un régimen discontinuo.

Otro elemento del sistema 40 de inactivación de fluorescencia puede ser un reflector 49 que puede estar dispuesto encima de la placa de microvaloración 92. El reflector 49 puede reflejar la radiación de inactivación emitida desde la fuente óptica 42 de regreso a través de la muestra biológica 140. Al hacer que la radiación pase un tiempo adicional, la inactivación de la señal fluorescente puede resultar más eficaz o eficiente. Por consiguiente, el sistema de inactivación puede comprender además al menos un espejo que refleje partes de la radiación de inactivación que no son absorbidas por la muestra biológica, o el tinte fluorescente, de vuelta a la muestra biológica.

Como se ha mencionado anteriormente, en las realizaciones descritas aquí, la plataforma 10 se mueve en el plano x-y de trabajo para colocar un punto o característica particular de la muestra 140 de ensayo biológica en el área de formación de imágenes del sistema 30 de formación de imágenes fluorescentes. De manera similar, el punto o característica se coloca a continuación sobre el sistema 40 de inactivación de fluorescencia moviendo la plataforma móvil 10 en el plano de trabajo x-y. No obstante, se debe entender que esto es sólo a modo de ejemplo, y que los sistemas ópticos 30 y 40 se pueden mover alternativamente con respecto a la muestra 140 de ensayo biológica. En otras palabras, en lugar de colocar el plano de trabajo x-y con respecto al sistema 30 de formación de imágenes de fluorescencia y el sistema 40 de inactivación de fluorescencia, el sistema 30 de formación de imágenes de fluorescencia y el sistema 40 de inactivación de fluorescencia se pueden ubicar con respecto a la muestra 140 de ensayo biológica.

La Figura 6 es una vista conceptual de otra realización del sistema 50 de inactivación de fluorescencia. A diferencia del sistema 40 de inactivación de fluorescencia, en el sistema 50 de inactivación de fluorescencia la fuente óptica 42 puede ser una fuente coherente tal como un láser 52. El láser 52 puede emitir luz a una longitud de onda específica o una banda estrecha de longitudes de onda. Como antes con respecto a la Figura 5, la radiación se puede reflejar desde un espejo dicróico 58 y a través de una lente objetivo 54 sobre la muestra 140 de ensayo biológica. A continuación, esta radiación se puede reflejar mediante el reflector adicional dispuesto encima de la placa 92 de valoración de pocillos múltiples. A continuación, este reflector óptico 59 puede reflejar la radiación láser de regreso a través de la muestra 140 de ensayo biológica para una segunda pasada. Al igual que con el reflector óptico 49, esto puede aumentar la eficacia de inactivación óptica de la señal fluorescente. No obstante, en la realización de láser de la Figura 6, los espejos 59 y el espejo dicróico 58 pueden formar una cavidad resonante y amplificar la radiación de láser emitida por la fuente de láser 52. Como antes, la cavidad resonante puede mejorar la eficacia de la fuente de radiación 42, proporcionando múltiples pasadas de radiación a la muestra sustancialmente en el mismo punto.

La Figura 7 es una vista lateral conceptual de otra realización del sistema de inactivación óptica 60. En el sistema de inactivación óptica 60, una vez más se enfoca una fuente de radiación 62 a través de una lente objetivo 64 y dentro de la placa 90 de valoración de pocillos múltiples. La fuente óptica 62 puede ser bien un diodo emisor de luz (LED 42 como en la Figura 4) o un láser (fuente de láser 52 como en la Figura 5). Al entrar en la placa 92 de valoración de pocillos múltiples, la radiación puede pasar a través de un soporte 170 de base de vidrio transparente de la placa 92 de valoración de pocillos múltiples. Esta base transparente 170 puede soportar una muestra 140 de ensayo biológica. La muestra 140 de ensayo biológica puede estar en la parte inferior de un pocillo particular de la placa 92 de valoración de pocillos múltiples, pero sumergida en un fluido tal como un fluido tampón 150. En la parte superior del pocillo particular de la placa de titulación multipocillo 92 puede haber un cubreobjetos 160. Este cubreobjetos puede descansar sobre la parte superior del fluido y del pocillo de microvaloración 92. La utilización de un cubreobjetos 160 puede evitar la formación del menisco de fluido en la parte superior de la columna de fluido en el pocillo particular de la placa 92 de valoración de pocillos múltiples. Los meniscos que se forman en el límite aire/líquido pueden tener una forma de cúpula que puede interferir con la transmisión directa de luz a través de los mismos, y por tanto con la formación de imágenes de la muestra 140 de ensayo biológica.

El recipiente que contiene al menos una muestra biológica con el tinte fluorescente puede estar cubierto con una placa de cubierta transparente o semitransparente. Una placa de cubierta transparente o semitransparente puede ser, por ejemplo, una cubierta de vidrio que sea transparente o esté provista de un revestimiento transparente para señales de fluorescencia pero reflectante con respecto a la inactivación de radiación. Como se muestra en la Figura 7, la radiación de la fuente óptica 62 puede pasar a través de la lente objetivo 64 y al interior de la muestra 140 de ensayo biológica sumergida en el fluido tampón 150, puede viajar a través de las dos superficies transparentes 170, a través de la muestra de ensayo y a través del cubreobjetos óptico 160. En este punto, la radiación puede incidir sobre el reflector óptico 69. El reflector óptico 69 puede estar dispuesto encima del pocillo de microvaloración 92 y orientado de manera que la reflexión no sea directamente antiparalela a la radiación entrante, sino que tenga un desplazamiento angular de manera que el reflejo recorra lateralmente cierta distancia hasta incidir sobre un segundo reflector óptico 69'. Una vez más, la radiación se refleja desde el reflector óptico 69' de regreso al reflector óptico 69. Con cada pasada, la radiación también viaja cierta distancia en dirección lateral. Por consiguiente, se logran múltiples pasadas de la radiación a través de la muestra de ensayo, antes de encontrar una barrera lateral o antes de que la radiación se extinga o absorba. Al igual que con la pasada doble descrita anteriormente, estas múltiples pasadas pueden mejorar la efectividad de la operación de inactivación en la etiqueta fluorescente fijada a la muestra 140 de ensayo biológica, y se puede lograr la inactivación completa de la luz fluorescente.

La Figura 8 es una vista lateral conceptual de otra realización del sistema 70 de inactivación óptica. Como en el sistema 60 de inactivación óptica, se enfoca una fuente de radiación 72 a través de una lente objetivo 74 y al interior del desechable 92, que puede ser una placa de valoración de pocillos múltiples o lado de cristal. La fuente óptica 72 puede ser bien un diodo emisor de luz (LED 42 como en la Figura 4) o bien un láser (fuente de láser 52 como en la Figura 5).

Al entrar en el desechable 92, la radiación puede pasar a través de un soporte 170 de base de vidrio transparente de desechable 92. Esta base transparente 170 puede soportar una muestra 140 de ensayo biológica. La muestra 140 de ensayo biológica puede estar en la parte inferior de un pocillo particular de desechable 92, pero sumergida en un fluido tal como un fluido tampón 150. Como en la Figura 7, en la parte superior del pocillo particular de desechable 92 puede haber un cubreobjetos 160. Este cubreobjetos puede descansar sobre la parte superior del fluido y desechable 92.

Al igual que con la realización anterior, la radiación de la fuente óptica 72 puede pasar a través de la lente objetivo 74 y hacia la muestra 140 de ensayo biológica sumergida en el fluido tampón 150. Por consiguiente, la radiación puede viajar a través de las dos superficies transparentes 170, a través de la muestra de ensayo y a través del cubreobjetos óptico 160. En este punto, la radiación puede incidir sobre el reflector óptico 69. El reflector óptico 69 puede estar dispuesto encima del pocillo de microvaloración 92, y en ángulo con respecto a las superficies 160 y 170. De esta manera, la luz de la fuente de luz 72 puede ser reflejada lateralmente a cierta distancia, incidiendo sobre otro reflector 69. Este reflector está dispuesto en sentido opuesto, de modo que la radiación que viaja horizontalmente se refleja en la dirección vertical y, por tanto, regresa a través de las superficies transparentes 160 y 170, y en una segunda pasada de regreso a través de la muestra 140 de ensayo biológica. Después de la segunda pasada, la radiación se refleja en los dos reflectores ópticos 69' que pueden ser idénticos a los reflectores ópticos 69, pero dispuestos debajo y lateralmente adyacentes a los reflectores ópticos 69. La radiación se refleja una vez más hacia los lados y de regreso a través de la muestra 140 de ensayo biológica. Con cada pasada, la radiación también viaja cierta distancia en dirección lateral. Por consiguiente, se logran múltiples pasadas de la radiación a través de la muestra de ensayo, antes de encontrar una barrera lateral o de que la radiación se extinga o absorba. Al igual que con la doble pasada descrita anteriormente, estas múltiples pasadas pueden mejorar la efectividad de la operación de inactivación en la etiqueta fluorescente fijada a la muestra 140 de ensayo biológica, y se puede lograr la inactivación completa de la luz fluorescente. Por consiguiente, como se ha descrito anteriormente, se pueden usar múltiples espejos para crear un sistema que genere muchas pasadas de la luz de inactivación a través de la muestra, como una celda multirreflectante de tipo Herriott o de tipo White o un resonador.

Si bien en la Figura 8 se muestran cuatro reflectores (69 y 69'), se debe entender que los conceptos aquí descritos se pueden extender a cualquier número de reflectores y pasadas.

La Figura 9 es una vista lateral conceptual de otra realización del sistema 80 de inactivación óptica. Como en el sistema 60 y 70 de inactivación óptica, una fuente de radiación 82 se enfoca a través de una lente objetivo 84 y al interior de la placa 92 de valoración de pocillos múltiples. La fuente óptica 82 puede ser un diodo emisor de luz (LED 42 como en la Figura 4) o un láser (fuente de láser 52 como en la Figura 5). Al entrar en la placa 92 de valoración de pocillos múltiples, la radiación puede pasar a través de un soporte 170 de base de vidrio transparente de la placa 92 de valoración de pocillos múltiples. Esta base transparente 170 puede soportar una muestra 140 de ensayo biológica. La muestra 140 de ensayo biológica puede estar en la parte inferior de un pocillo particular de la placa 92 de valoración de pocillos múltiples, pero sumergida en un fluido tal como un fluido tampón 150. En la parte superior del pocillo particular de la placa 90 de valoración de pocillos múltiples puede haber un cubreobjetos 160. Este cubreobjetos 160 puede descansar sobre la parte superior del fluido y del pocillo de microvaloración 92.

Al igual que con la realización anterior, la radiación de la fuente óptica 82 puede pasar la lente objetivo 84 y, a través de la superficie 69 de transmisión parcial, al interior de la muestra 140 de ensayo biológica sumergida en el fluido tampón 150. Como antes, la radiación puede viajar a continuación a través de la superficie transparente 170, a través del muestra, y a través del cubreobjetos óptico 160. En este punto, la radiación puede incidir sobre un segundo reflector 69" óptico parcialmente transmisor. El reflector óptico 69" puede estar dispuesto sobre el pocillo de microvaloración 92, ortogonal a la trayectoria de la radiación y paralelo al reflector óptico 69. Debido a que ambos reflectores ópticos 69 y 69" son parcialmente reflectantes y parcialmente transmisores, pueden formar un resonador óptico cuando se usan junto con una fuente de radiación coherente tal como el láser 82. Por consiguiente, los ajustes finos en la ubicación del reflector 69" con respecto al reflector 69 pueden tener un efecto muy considerable sobre la cantidad de radiación que circula dentro del resonador y, de este modo, sobre la eficacia de inactivación del sistema 80 de inactivación fluorescente. Por consiguiente, se logran múltiples pasadas de la radiación a través de la muestra, antes de que el fotón salga del resonador a través del reflector terminal 69 o el fotón se extinga o se absorba. Al igual que con la doble pasada descrita anteriormente, estas múltiples pasadas pueden mejorar la efectividad de la operación de inactivación en la etiqueta fluorescente fijada a la muestra 140 de ensayo biológica, y se puede lograr la inactivación completa de la luz fluorescente.

Por consiguiente, el sistema de inactivación óptica puede comprender además una fuente de luz láser y dos espejos encima y debajo del desechable, que definen una cavidad resonante para la fuente de luz láser.

Se debe entender que cualquiera y todas estas realizaciones también se pueden acoplar con un detector de fluorescencia y un ordenador como se describe con respecto a la realización ilustrada en la Figura 5. Por consiguiente, la fuente óptica 42, 52, 62, 72 y 82 puede estar bajo control de retroalimentación hasta que se logre la inactivación completa de la señal de fluorescencia.

Método de utilizar el aparato según la invención

Habiendo descrito los componentes de los sistemas 30 de formación de imágenes de fluorescencia a modo de ejemplo y los sistemas 40 de inactivación de fluorescencia a modo de ejemplo, a continuación se describe un método para utilizar el aparato. Se debe entender que este método puede hacer uso de cualquiera y todos los componentes en las realizaciones descritas con anterioridad. El método en general se describe a continuación, seguido de un algoritmo específico como se ilustra en la Figura 10.

El sistema de la invención permite la detección, localización y formación de imágenes de restos diana como antígenos en las muestras biológicas reconocidas por los reactivos fluorescentes. Con el sistema de la invención, las células se pueden inmovilizar y a continuación poner en contacto con los reactivos fluorescentes. Los anticuerpos son reconocidos por los antígenos respectivos en la muestra biológica (por ejemplo, en una superficie celular) y después de eliminar el reactivo fluorescente no unido y excitar los restos fluorescentes, la ubicación del antígeno se detecta mediante la emisión de fluorescencia del reactivo fluorescente.

La ubicación de los restos objetivo se logra mediante un dispositivo de formación de imágenes digitales con una resolución y sensibilidad suficientes para la longitud de onda de la radiación fluorescente. El dispositivo de formación de imágenes digitales se puede utilizar con o sin ampliación óptica, por ejemplo, con un microscopio de fluorescencia. Las imágenes resultantes se almacenan en un dispositivo de almacenamiento adecuado, tal como un disco duro, por ejemplo en formato RAW, TIF, JPEG o HDF5.

Para detectar diferentes antígenos, se proporcionan diferentes reactivos fluorescentes que comprenden diferentes restos de reconocimiento de antígeno que tienen el mismo resto fluorescente o uno diferente. Dado que la detección paralela de emisión de fluorescencia con diferentes longitudes de onda es limitada, el reactivo fluorescente se utiliza de forma individual y secuencial o en pequeños grupos (2-10) uno tras otro. En esta variante, se puede utilizar un número apropiado de detectores. Preferentemente, sólo se usa un detector para detectar la emisión de fluorescencia de los diversos reactivos de fluorescencia enmascarando posteriormente todas las emisiones de fluorescencia menos una con un filtro.

En una variante de la invención, las muestras de ensayo biológicas - especialmente suspensiones de células - de la muestra se inmovilizan por atrapamiento en microcavidades o por adherencia.

En general, el método de la invención se puede llevar a cabo en diversas variantes. Por ejemplo, el conjugado no reconocido por un resto diana se puede eliminar lavando, por ejemplo, con tampón antes de que se detecte el resto diana marcado con el reactivo fluorescente.

En una variante de la invención, se proporcionan al menos dos reactivos fluorescentes de forma simultánea o en secuencias de tinción posteriores, en las que cada resto de reconocimiento de antígeno reconoce antígenos diferentes.

La eliminación de la emisión de fluorescencia se puede controlar para optimizar el tiempo de proceso. En la presente invención, la eliminación de la emisión de fluorescencia se logra cuando la emisión de fluorescencia se reduce a menos de un 5 %, preferentemente menos de un 1 % de la emisión de fluorescencia inicial. Por motivos de conveniencia, la eliminación de fluorescencia se puede medir en la longitud de onda de la emisión más alta, pero también es adecuado calcular la integral de los espectros de emisión. En la variante de proporcionar simultáneamente más de un reactivo fluorescente, la reducción de la emisión de fluorescencia se basa en cada una de las emisiones de fluorescencia medidas.

Los sistemas y métodos incluyen dos sistemas ópticos, un sistema 30 de formación de imágenes de fluorescencia y un sistema 40 de inactivación óptica. Estos dos sistemas se colocan lateralmente uno al lado del otro, y generalmente debajo de uno de los pocillos de la placa de microvaloración 92 que contiene la muestra. En otras palabras, la fuente de luz de la unidad de inactivación está dispuesta lateralmente en posición adyacente al sistema de fluorescencia. Alternativamente, según una realización que no forma parte de la presente invención, la unidad de inactivación puede estar dispuesta por encima del plano de trabajo. Las placas de microvaloración 90 y 92 se pueden colocar en las aberturas de una plataforma móvil 10, que mueve los pocillos con respecto al sistema 70 de manipulación de fluidos o los sistemas ópticos 30 y 40.

En general, una pluralidad de muestras biológicas presentes en la placa de microvaloración 92 se tiñen con uno de los reactivos presentes en la placa de microvaloración 90. Colocando el pocillo de fluido apropiado de la placa de microvaloración 90 debajo de la pipeta 70 para toma de muestra, el reactivo se puede retirar aplicando succión a la pipeta 70. A continuación, el reactivo se administra a la muestra biológica apropiada desplazando la etapa x-y lateralmente hasta que el pocillo adecuado esté debajo de la pipeta 70. El reactivo se administra a la muestra biológica.

Después de la incubación, el sistema 30 de formación de imágenes fluorescentes puede formar imágenes de la muestra moviendo la plataforma x-y móvil para llevar la muestra al campo de visión del sistema 30 de formación de imágenes fluorescentes. A continuación, el plano de trabajo x-y se desplaza lateralmente, de modo que la muestra biológica se coloca en la región iluminada del sistema 40 de inactivación de la fluorescencia. La fluorescencia se inactiva entonces mediante radiación óptica, oxidación o degradación enzimática y lavado posterior. Después de una inactivación adecuada, opcionalmente se forman imágenes de la muestra con fines de corrección/control y

posteriormente se aplica otro reactivo a la muestra y se repite el proceso. Esta secuencia de etapas se puede repetir hasta que se haya aplicado una gran cantidad de reactivos a al menos una muestra biológica.

Se debe entender que se pueden añadir, según sea apropiado, etapas adicionales tales como adición de tampón, lavado, adición o retirada de fluido, enfriamiento y calentamiento.

5 La Figura 10 es un diagrama de flujo simplificado de un método particular para usar la herramienta de análisis automatizado para el análisis de muestras de ensayo biológicas descrita anteriormente con respecto a las Figuras 1-9. El método comienza en la etapa S10 y continúa hasta la etapa S20. En la etapa S20, la muestra se tinte con al menos un reactivo fluorescente y se incubada. En la presente realización, se aplica DAPI seguido de dos reactivos fluorescentes como FITC y PE. Durante la incubación, los reactivos pueden ser absorbidos por la muestra de ensayo biológica. En la etapa S30, se lava la muestra. En este etapa, se puede añadir tampón adicional al pocillo mediante una pipeta. A continuación se retira el exceso de líquido con una pipeta. En la etapa S40, la muestra se coloca sobre el sistema de formación de imágenes de fluorescencia y se obtiene la imagen DAPI. Esta imagen puede identificar estructuras prominentes en la muestra de ensayo, tales como el núcleo, las mitocondrias, etc. Estas estructuras prominentes pueden servir como puntos de referencia para permitir que el sistema de formación de imágenes coloque la muestra exactamente en la misma ubicación, después de reubicar el desechable entre las etapas de formación de imágenes e inactivación.

A continuación, el sistema de formación de imágenes fluorescentes se puede configurar para obtener imágenes de fluorescencia de FITC y PE en la etapa S50. La imagen adquirida en estas condiciones puede ser indicativa de la unión de la muestra con los anticuerpos conjugados con los fluoróforos FITC o PE. En la etapa posterior S60, se pregunta si se han fotografiado todos los marcadores. En caso de ser así, el proceso finaliza en la etapa S70. Si quedan marcadores adicionales, la muestra de ensayo se blanquea o se inactiva la fluorescencia en la etapa S80. Esta etapa de blanqueo puede ir acompañada de desplazamiento mecánico del desechable en dirección lateral de modo que la muestra quede colocada sobre el sistema de inactivación.

Por consiguiente, la rutina puede incluir la inactivación de una señal de fluorescencia mediante el sistema de inactivación entre la aplicación de diferentes compuestos. La muestra se puede reposicionar localizando las características o puntos de referencia previamente identificados bajo control por ordenador. El ordenador puede mover el plano de trabajo de manera que se muestren las mismas características en aplicaciones repetidas de los diferentes compuestos, brindando una vista comparativa de la muestra biológica y su interacción con los diferentes compuestos aplicados.

30 A continuación se vuelven a formar imágenes del DAPI para reubicar la muestra con respecto a las imágenes tomadas en la etapa S40, y se toma nuevamente la imagen de fluorescencia de FITC y PE. Si la fluorescencia se ha inactivado o extinguido, el método vuelve a la etapa S20, en la que se aplica un nuevo tinte y se incubada la muestra.

En una variante de la invención, la reubicación de la muestra se puede lograr no mediante tinción DAPI de la muestra sino proporcionando al recipiente que contiene la muestra una partícula/mancha o punto de un marcador de fluorescencia. Esta variante resulta especialmente útil cuando la muestra son células aisladas en microcavidades.

También se muestra en el diagrama de flujo de la Figura 9 el bucle en el que la fluorescencia no se ha inactivado por completo y el bucle se repite. Este método se corresponde de la manera más estrecha con la realización mostrada en la Figura 4, con el sistema 40 de inactivación de fluorescencia bajo control de retroalimentación. En la etapa S110, se mide la fluorescencia para ver si ha caído por debajo de un nivel umbral. Como ya se ha divulgado, la eliminación de fluorescencia se puede medir en la longitud de onda de la emisión más alta, pero también resulta adecuado calcular la integral de los espectros de emisión. En esta variante de la invención, la unidad de control y/o unidad de inactivación están configuradas de manera que cuando la emisión de fluorescencia no se elimina mediante inactivación por debajo de un umbral predefinido, se repite el proceso de inactivación. Por ejemplo, se considera que se logra la inactivación de la emisión de fluorescencia cuando la emisión de fluorescencia se reduce a menos de un 5 %, preferentemente menos de un 1 % de la emisión de fluorescencia inicial. En caso de ser así, el proceso vuelve a la etapa S20. En caso contrario, el proceso de inactivación se repite en la etapa S80.

Más generalmente, el método automatizado puede incluir mantener al menos una muestra biológica con el tinte fluorescente en un recipiente en una abertura sobre una plataforma, excitar el tinte fluorescente y formar imágenes de las señales de fluorescencia obtenidas a partir del tinte fluorescente con un sistema de fluorescencia, moviendo al menos uno de la abertura, la plataforma, el sistema de fluorescencia y la unidad de inactivación en al menos dos dimensiones ortogonales que definen un plano de trabajo hasta que la muestra biológica esté en posición adyacente a la unidad de inactivación, inactivando la señal de fluorescencia con la unidad de inactivación, y formando imágenes de la muestra biológica después de la inactivación. El método automatizado puede comprender además transferir una secuencia de fluidos con un sistema de manipulación de fluidos al recipiente que contiene la muestra biológica, y ejecutar una rutina que incluye la excitación del tinte fluorescente, detección y recogida de señales de fluorescencia e inactivación de señales de fluorescencia de manera automatizada con la secuencia de fluidos.

5 Si bien se han descrito diversos detalles junto con las implementaciones a modo de ejemplo descritas anteriormente, diversas alternativas, modificaciones, variaciones, mejoras y/o equivalentes sustanciales, ya sean conocidos o que son o pueden ser actualmente imprevistos, pueden resultar evidentes al revisar la divulgación anterior. Además, los detalles relacionados con los métodos específicos, dimensiones, uso de materiales, formas, técnicas de fabricación, etc. pretenden ser únicamente ilustrativos, y la invención no se limita a dichas realizaciones. Descriptores tales como arriba, abajo, izquierda, derecha, atrás, adelante, etc. son arbitrarios, ya que se debe entender que los sistemas y métodos se pueden llevar a cabo en cualquier orientación. Por consiguiente, las implementaciones a modo de ejemplo expuestas anteriormente pretenden ser ilustrativas, no limitantes. La invención sólo está limitada por las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema automatizado para analizar muestras biológicas teñidas con al menos un tinte fluorescente, que comprende:
- 5       - un sistema de fluorescencia que comprende una unidad de excitación y una unidad de detección de señales de fluorescencia obtenidas a partir del tinte fluorescente;
- una abertura para albergar al menos un recipiente que contiene al menos una muestra biológica con el tinte fluorescente;
- una unidad de inactivación que inactiva la señal de fluorescencia;
- una manipulación de fluidos que suministra y/o retira fluidos hacia y/o desde el recipiente;
- 10       - un mecanismo que mueve al menos uno de la abertura, el sistema de fluorescencia, la unidad de inactivación y el sistema de manipulación de fluidos en al menos dos dimensiones ortogonales que definen un plano de trabajo;
- y una unidad de control que ejecuta una rutina que incluye la excitación del tinte fluorescente, detección y recogida de señales de fluorescencia e inactivación de señales de fluorescencia de forma automatizada, caracterizado por que la unidad de inactivación comprende una fuente de luz dispuesta lateralmente en posición adyacente al sistema de fluorescencia y que emite radiación de inactivación y en el que la unidad de inactivación comprende más de una
- 15       fuente de luz que emite radiación de inactivación de diferentes longitudes de onda.
2. El sistema automatizado de la reivindicación 1, en el que el sistema de manipulación de fluidos proporciona al menos uno de tintes fluorescentes, compuestos que inactivan las señales de fluorescencia, fluidos de lavado y tampón a la muestra biológica.
- 20       3. El sistema automatizado de la reivindicación 1 o 2, en el que el sistema de manipulación de fluidos comprende un sistema de pipeta controlado robóticamente dispuesto en una plataforma, en el que el sistema de toma de muestra con pipeta se puede mover a lo largo de un eje z ortogonal al plano de trabajo.
4. El sistema automatizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sistema de manipulación de fluidos comprende un medio para limpiar el exterior del sistema de pipetas de fluidos adheridos.
- 25       5. El sistema automatizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la unidad de control recoge las señales de fluorescencia en forma de imágenes de la muestra biológica teñida con un tinte fluorescente.
6. El sistema automatizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además al menos un recipiente de fluido adicional que contiene al menos uno de los reactivos, restos de reconocimiento de antígeno que tienen restos de detección, anticuerpos con tintes fluorescentes, antibióticos, nutrientes biológicos, toxinas, colorantes y oxidantes.
- 30       7. El sistema automatizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el recipiente comprende una pluralidad de pocillos de fluido, cada uno de los cuales contiene una muestra biológica separada.
8. El sistema automatizado de la reivindicación 6, en el que el recipiente es una placa de valoración.
9. El sistema automatizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el recipiente comprende partes transparentes y no transparentes, en el que la muestra biológica está situada en la parte transparente y las partes no transparentes reflejan o absorben las señales de fluorescencia.
- 35       10. El sistema automatizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la unidad de inactivación comprende además al menos un espejo que refleja una parte de la radiación de inactivación que no es absorbida por la muestra biológica o el tinte fluorescente de regreso a la muestra biológica.
11. El sistema automatizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la unidad de inactivación comprende un medio para homogeneizar la radiación y/o la intensidad de la radiación por área superficial de la muestra.
- 40       12. El sistema automatizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la unidad de inactivación comprende un filtro que elimina sustancialmente radiación que tiene una longitud de onda inferior a 400 nm y superior a 900 nm de la radiación de inactivación.
13. El sistema automatizado de la reivindicación 9, en el que el sistema de inactivación incluye además un detector de fluorescencia que monitoriza la caída de la señal de fluorescencia en forma de datos de inactivación.
- 45       14. El sistema automatizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la unidad de control controla la unidad de inactivación con un bucle de retroalimentación basado en los datos de inactivación.

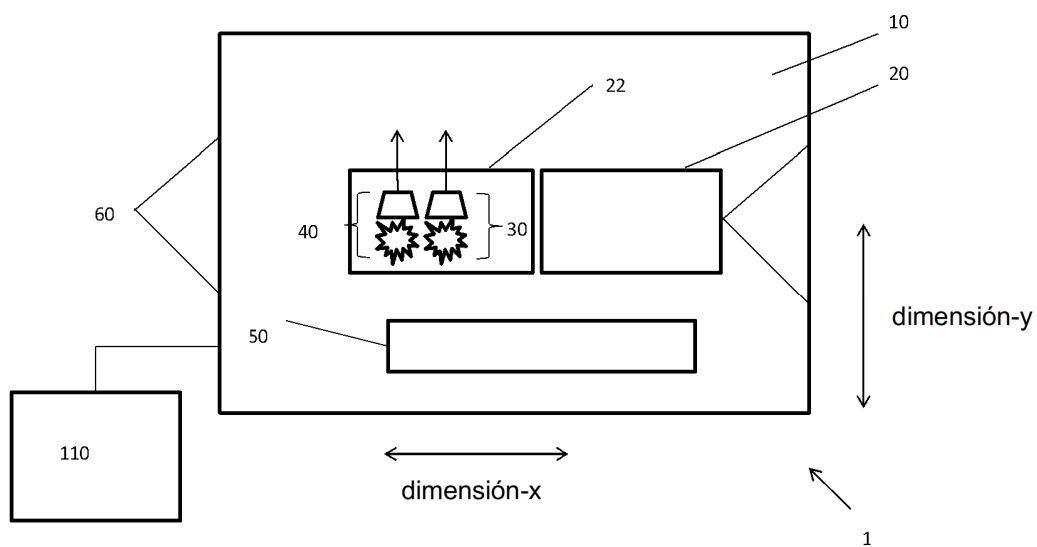


Fig. 1

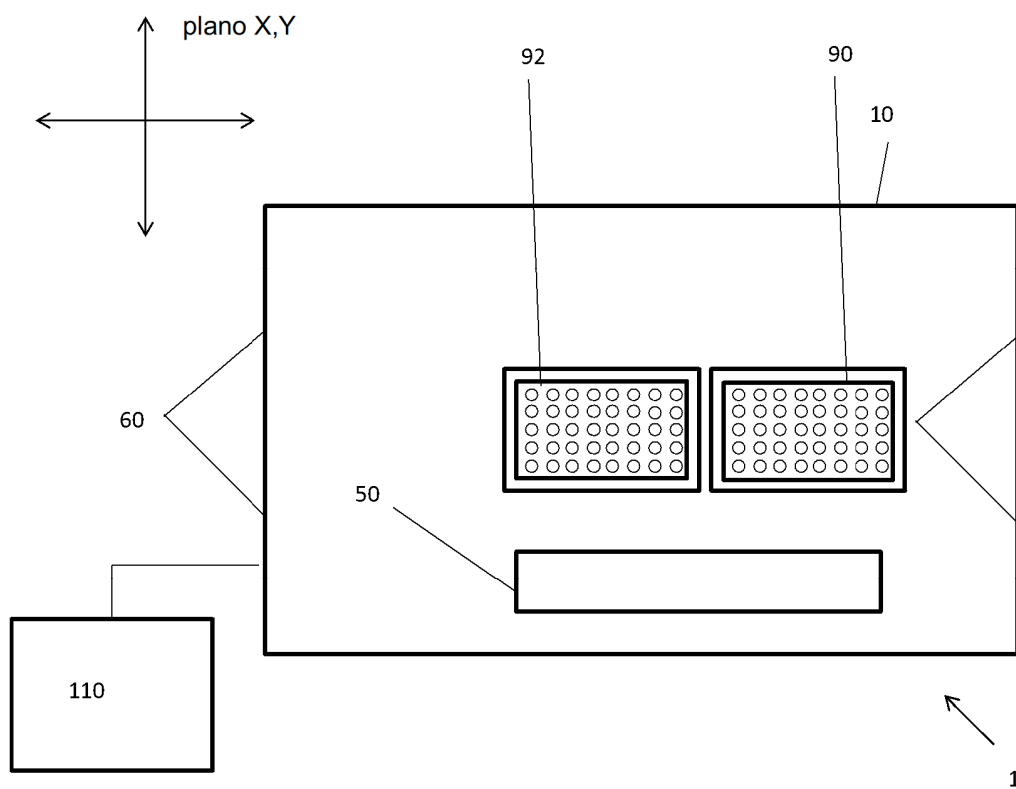


Fig. 2



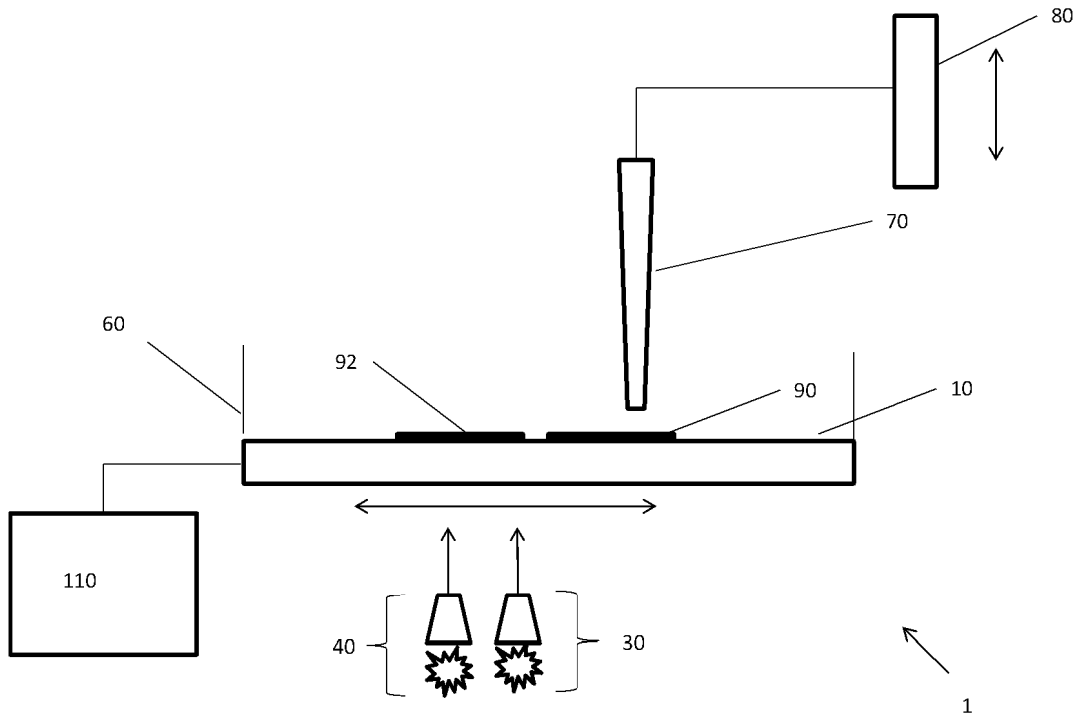


Fig. 3

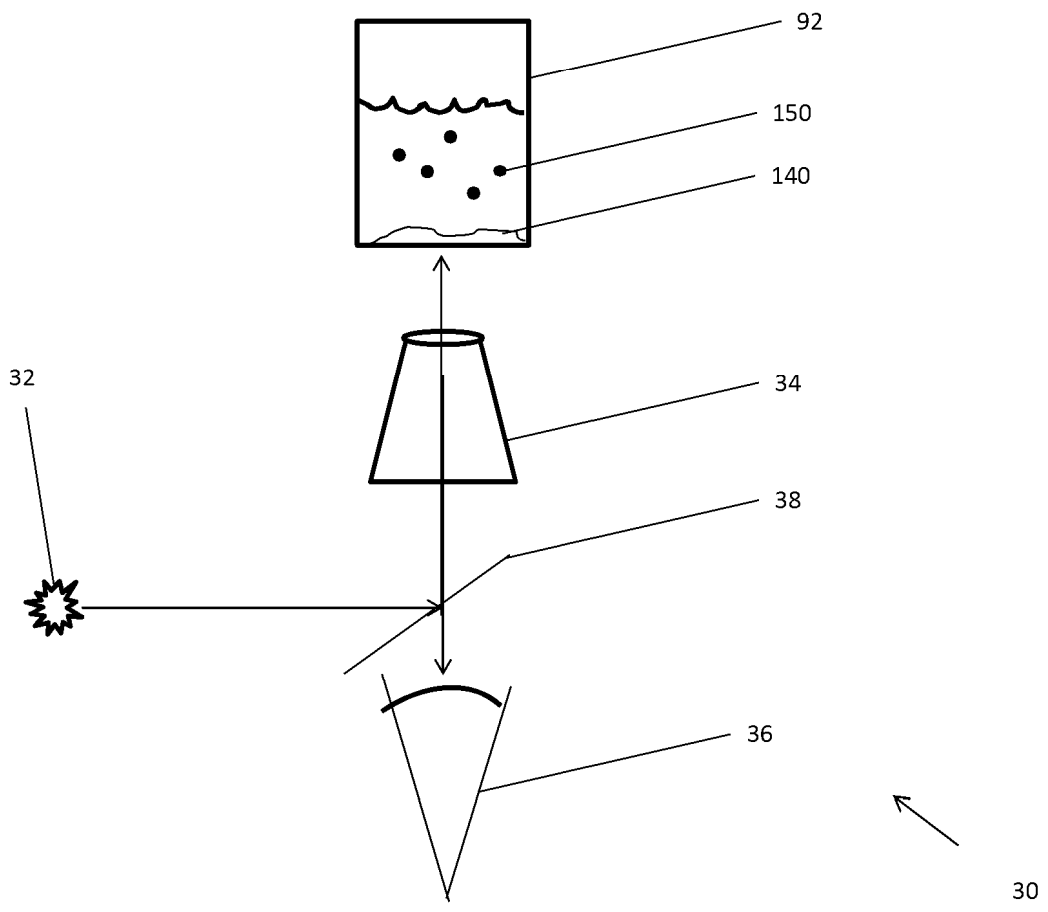


Fig. 4

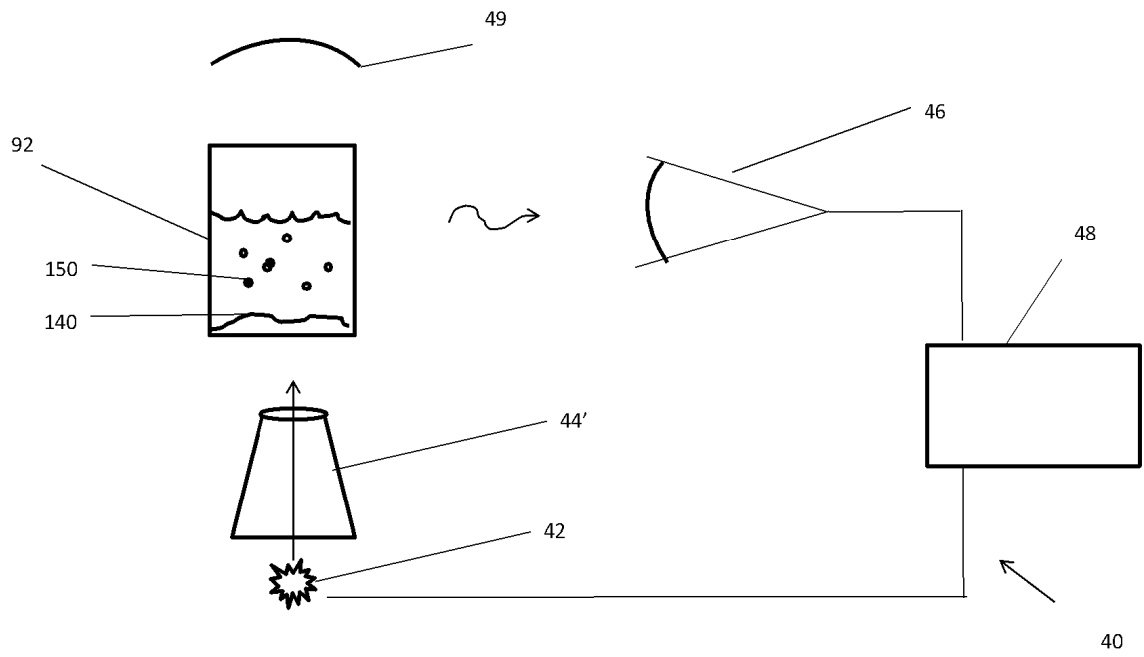
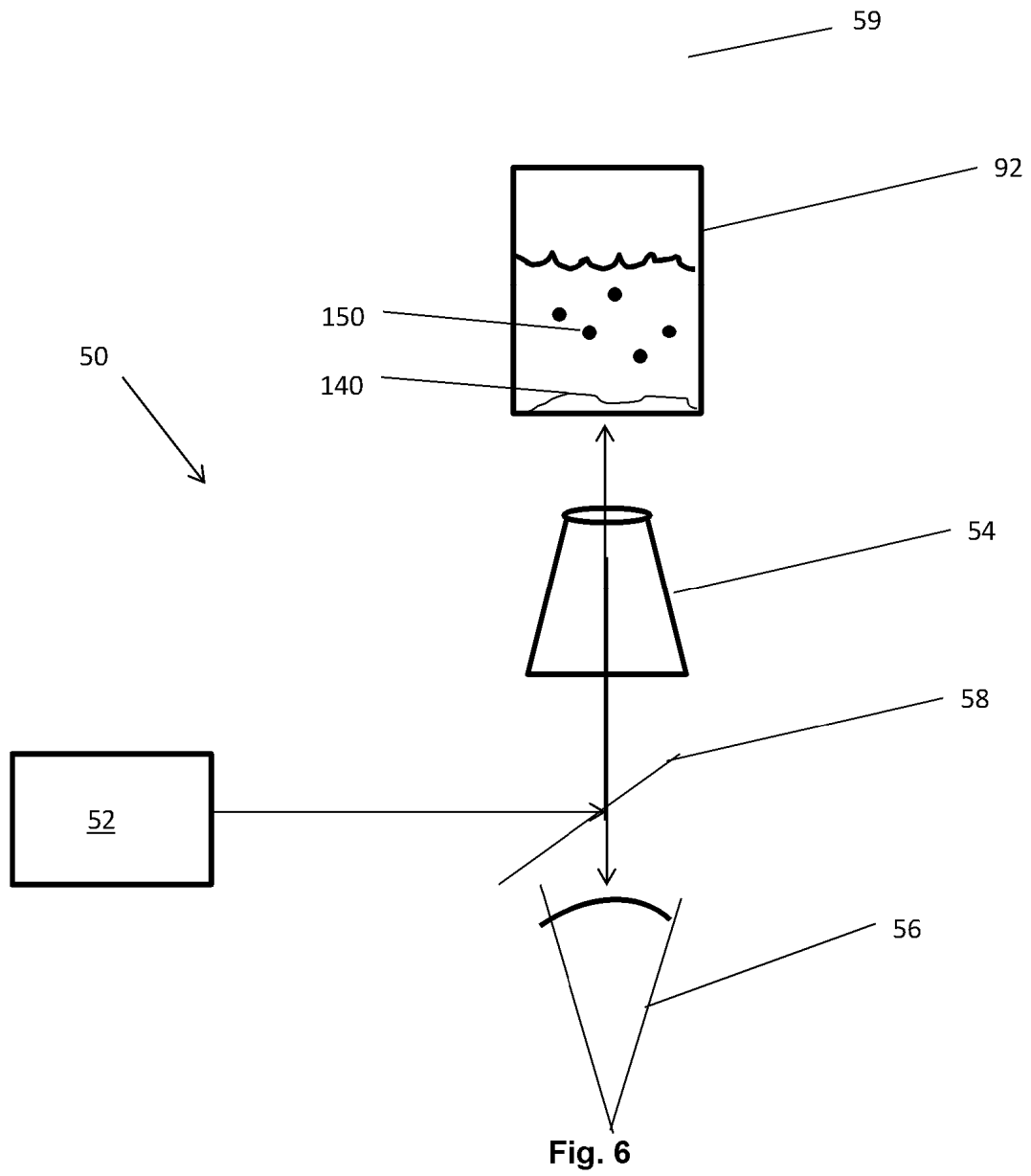


Fig. 5



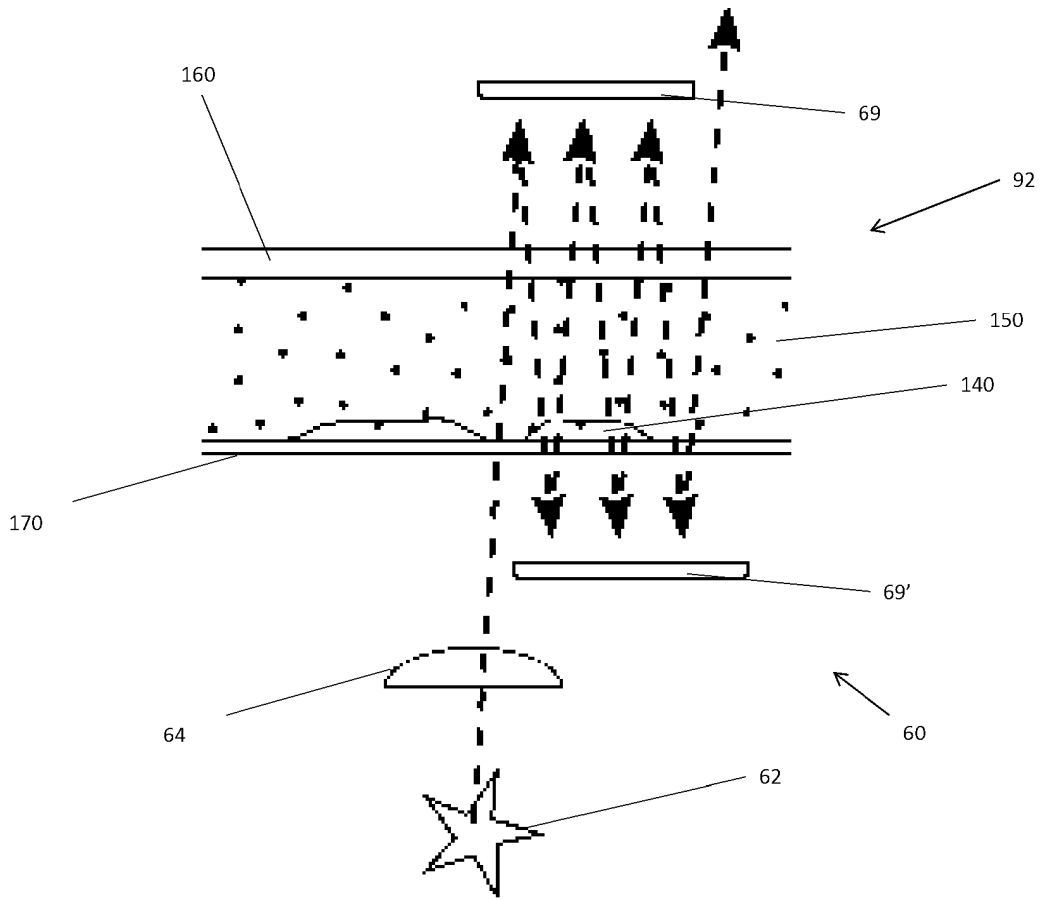


Fig. 7

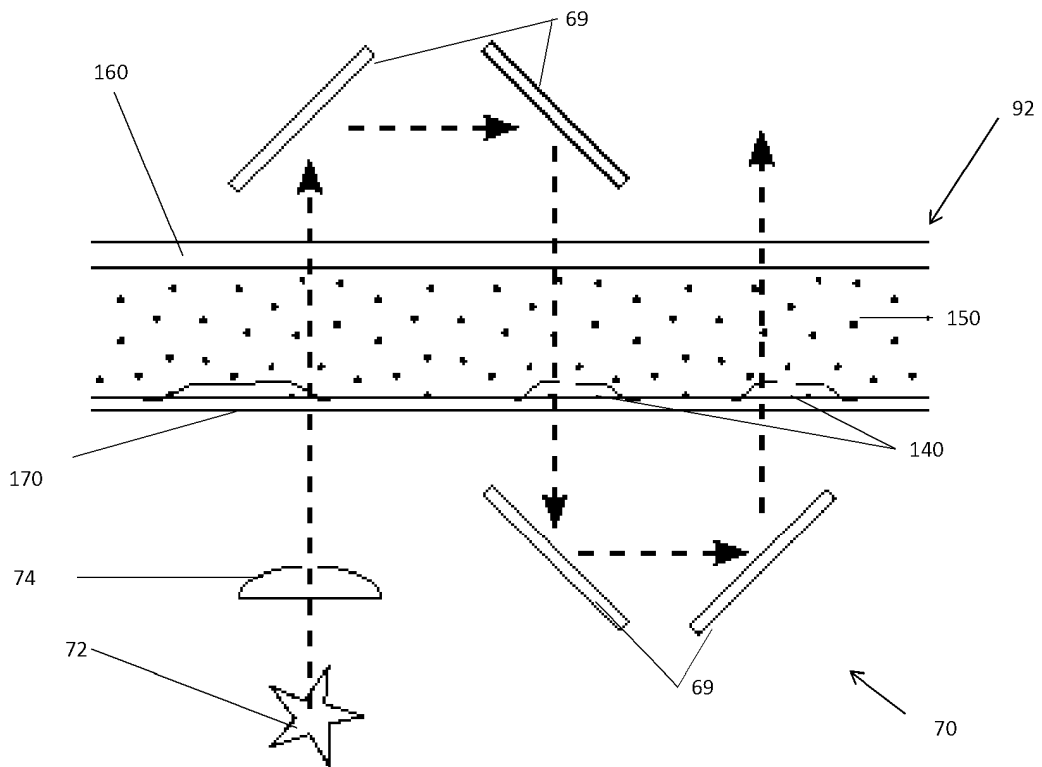


Fig. 8

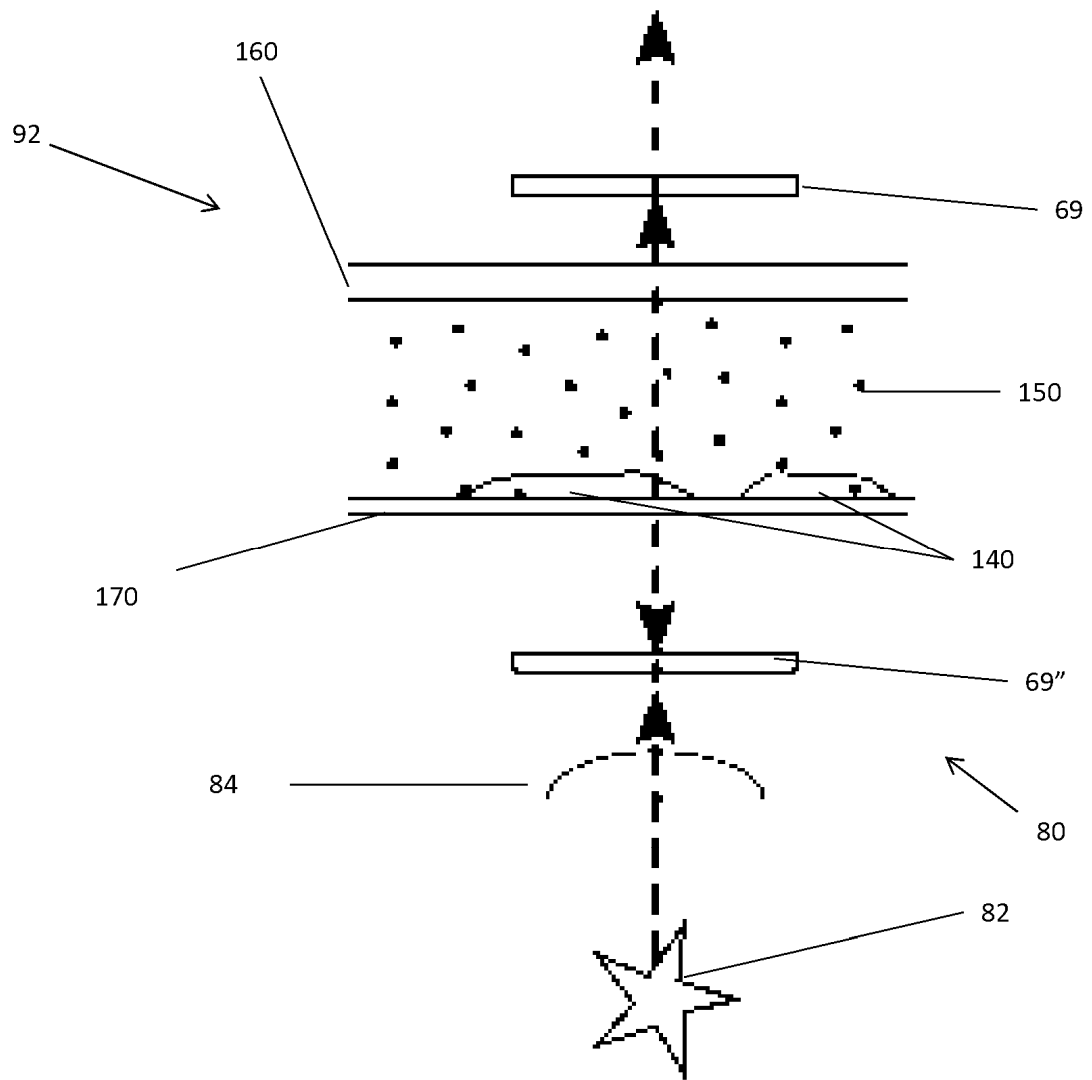


Fig. 9

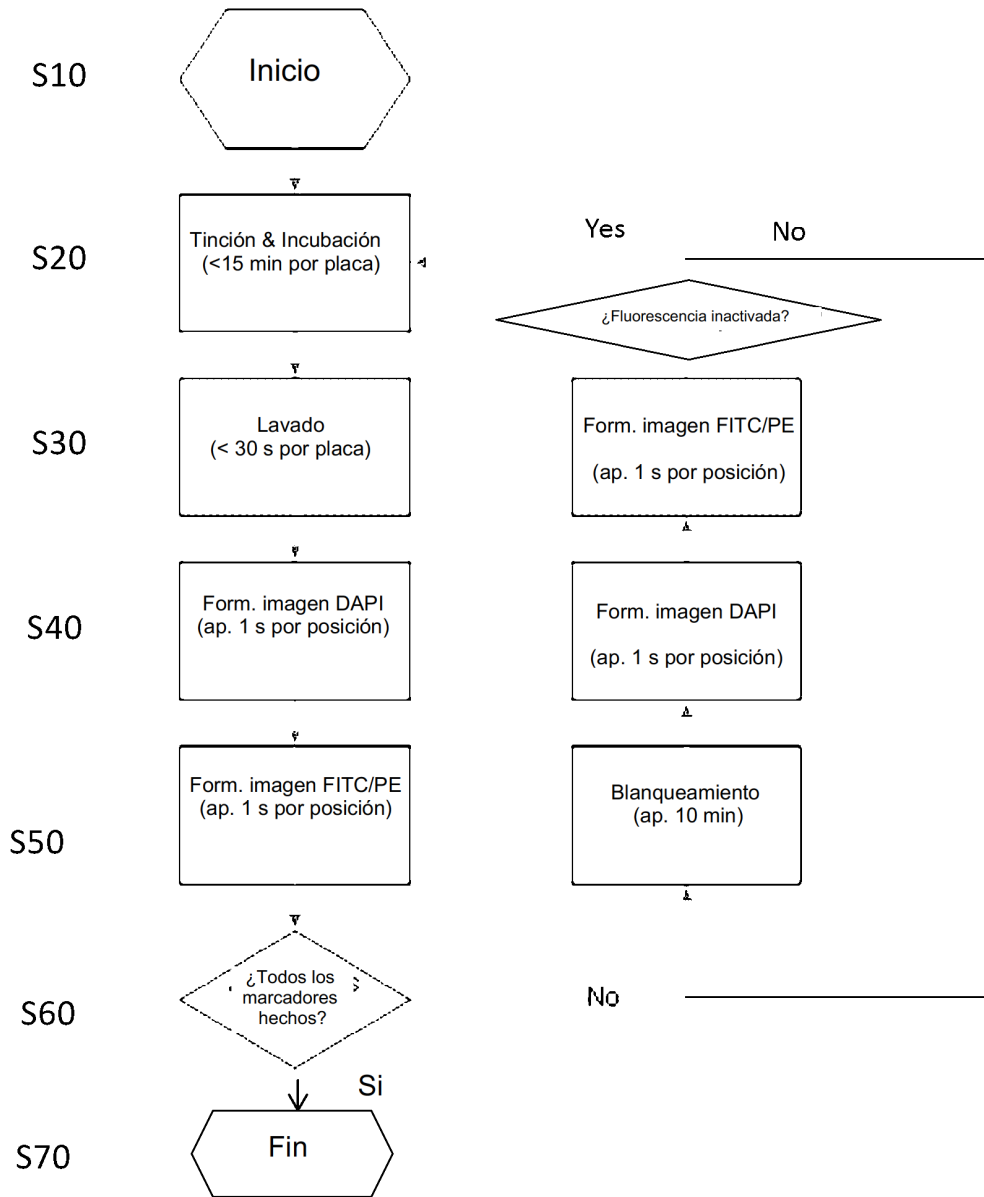


Fig. 10