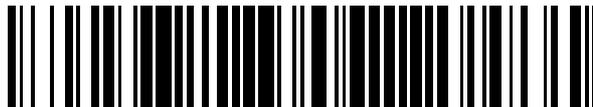


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 857**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2008 E 08762689 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2152859**

54 Título: **Método y dispositivo para el diagnóstico prenatal no invasivo**

30 Prioridad:

04.05.2007 IT TO20070307

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

22.03.2013

73 Titular/es:

**SILICON BIOSYSTEMS S.P.A. (100.0%)
VIA DEI LAPIDARI, 12
40129 BOLOGNA, IT**

72 Inventor/es:

**MANARES, NICOLÒ;
FITTIPALDI, ANTONIO;
GIORGINI, GIUSEPPE y
MEDORO, GIANNI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 398 857 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

Método y dispositivo para el diagnóstico prenatal no invasivo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a métodos para el diagnóstico prenatal no invasivo, en particular para la identificación de trastornos genéticos y cromosómicos en el feto.

Estado de la técnica

El diagnóstico prenatal para trastornos cromosómicos se introdujo con el objetivo de poner de manifiesto anomalías de los cromosomas en el feto.

10 Hasta ahora, la certidumbre de diagnóstico de un feto que está afectado por un trastorno cromosómico puede obtenerse sólo por medio de pruebas de diagnóstico invasivas, que examinan las células embrionarias con el fin de determinar el cariotipo por medio de amniocentesis, toma de muestras de las vellosidades coriónicas o cordocentesis.

15 Todas estas pruebas son invasivas e implican un aumento del riesgo de aborto. Por tanto, habitualmente se recomiendan para mujeres de más de 35 años de edad, o mujeres que en un embarazo anterior han tenido un hijo afectado por trastornos cromosómicos o cuando la ecografía identifica un feto con una malformación.

20 El descubrimiento de la existencia de células fetales, aunque poco común, en la circulación materna ha llevado a muchos grupos a investigar y desarrollar métodos para el aislamiento y la recuperación de dichas células que permiten el diagnóstico prenatal no invasivo. En particular, existen tres tipos principales de células fetales que pueden pasar a través de la barrera placentaria: los linfocitos, los trofoblastos y los eritroblastos. De éstos, se ha dirigido la investigación sobre todo al estudio de métodos para el aislamiento de eritroblastos fetales de la sangre materna periférica y trofoblastos, células epiteliales que se derivan de la placenta. El aislamiento de los trofoblastos de la sangre periférica está limitado por su morfología multinucleada, mientras que se ha demostrado [8-13] que estas células están presentes, entre la 6ª y la 15ª de gestación, en muestras transcervicales. Debe observarse que los trofoblastos que migran desde la placenta se adhieren a menudo a otros trofoblastos o células maternas formando agrupaciones.

25

30 La identificación de células fetales también se ha hecho posible recientemente mediante métodos de biología molecular aplicados directamente a células fetales no cultivadas. Dichos métodos son por ejemplo FISH (hibridación fluorescente *in situ*) prenatal y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente (QF-PCR). La QF-PCR es un método que puede identificar y cuantificar simultáneamente secuencias de ADN específicas de cromosomas que, pudiendo aplicarse a células individuales, ha permitido el análisis genético basándose en un número muy pequeño de células fetales. En la bibliografía, existen numerosas publicaciones, incluyendo algunas revisiones [1-6, véase la Bibliografía al final de la descripción], cuyo contenido se incorpora al presente documento para las partes necesarias mediante simple referencia, referentes al uso de QF-PCR en análisis prenatales.

35 D.W. Bianchi y colaboradores desarrollaron [14-27] un sistema de aislamiento de los eritrocitos nucleados fetales (NRBC) de sangre materna basándose en puntuación multiparamétrica; los parámetros incluyen dos características morfológicas (circularidad y morfología del núcleo) y dos propiedades del marcaje de hemoglobina fetal (intensidad de fluorescencia y luminosidad periférica del citoplasma). El protocolo prevé la separación de las células mononucleadas con gradiente de densidad y enriquecimiento mediante reducción de los leucocitos (MACS con anticuerpos para CD15 y CD45) y aislamiento en citofluorímetro con método FACS usando un anticuerpo anti-hemoglobina gamma. Las células identificadas mediante la puntuación multiparamétrica se recuperan usando un micromanipulador bajo observación microscópica.

40

El sistema de puntuación es muy laborioso y el uso del micromanipulador provoca la pérdida de parte de las células. En general, este método ha mostrado una sensibilidad del 74% en la recuperación de células fetales combinada con una frecuencia de falsos positivos del 5%.

45 La separación de las células mononucleadas con gradiente de densidad y enriquecimiento de la muestra mediante MACS con reducción de las células CD71+, marcadas adicionalmente con anticuerpos específicos para las cadenas gamma y épsilon de hemoglobina fetal, también se conoce a partir de otros trabajos [7]. Dicho marcaje puede producir, sin embargo, resultados no específicos, ya que existen casos de producción de hemoglobina fetal en células de adulto, o debido a la reticulación entre el anticuerpo para la hemoglobina fetal y la hemoglobina de adulto, provocada por la similitud de estas cadenas de hemoglobina.

50

Monaliza Medical Ltd. (patente estadounidense 2005/0181429 A1) desarrolló un método de análisis genético

5 prenatal usando células transcervicales. El método se basa en el uso de un cepillo para citología vaginal para la recuperación de muestras transcervicales, que se procesan por medio de citocentrifugación para la preparación de portaobjetos. Las células transcervicales se marcan y se analizan bajo el microscopio y se memorizan su ubicación y coordenadas en el portaobjetos. El portaobjetos se analiza en FISH y se identifican las células trofoblásticas usando las coordenadas obtenidas previamente. La desventaja de dicho método es que durante el procesamiento para la preparación del portaobjetos, parte de las células transcervicales se pierden, sin obtener un resultado claro (*no-call*) debido a la falta de trofoblastos.

10 AVIVA-Biosciences Corporation (véase, por ejemplo, el documento EP-A-1439897) desarrolló un sistema de enriquecimiento basado en biochips para aislar células fetales de sangre materna. Este método usa un reactivo que permite la retirada de la mayoría de los eritrocitos, la clasificación por medio de perlas magnéticas altamente específicas y un cóctel de anticuerpos específicos para antígenos fetales y enriquecimiento por medio de cámaras de filtración de alta resolución con poros que tienen diámetro variable según el tipo de células que vaya a aislarse. Nagy Gyula Richard *et al*, "Isolation of...", *Prenatal Diagnosis*, vol. 25, N.º 5, mayo de 2005, páginas 398-402 describen el aislamiento de células fetales positivas para la cadena épsilon de hemoglobina con micromanipulación.

15 Dicho método, sin embargo, está restringido a la selección de células fetales por medio de enriquecimiento de la muestra, lo que no limita la posibilidad de haber contaminado células maternas y por tanto el consiguiente riesgo de un análisis genético no fiable.

20 Brevemente, ninguno de los métodos no invasivos mencionados anteriormente ha demostrado hasta el momento que pueda usarse como práctica de rutina para el diagnóstico de aneuploidías y/u otros defectos cromosómicos fetales.

25 El objetivo de la presente invención es, por tanto, proporcionar un método para el diagnóstico prenatal no invasivo, basado en la toma de muestras de un fluido materno orgánico, con alta probabilidad de contener células nucleadas fetales circulantes y su posterior aislamiento, en particular un fluido uterino, endocervical o transcervical, o sangre materna periférica. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método para el diagnóstico prenatal que puede automatizarse, sin falsos negativos, y con un número pequeño de falsos positivos y resultados que no son claros.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos para el diagnóstico prenatal no invasivo, en particular para la identificación de anomalías genéticas en el feto.

30 Según la presente invención, por tanto, el diagnóstico se realiza basándose en un fluido materno orgánico con alta probabilidad de contener células nucleadas fetales y el posterior aislamiento de las mismas, en particular a partir de un fluido uterino, endocervical o transcervical o sangre materna periférica, identificar y analizar las células fetales presentes en el mismo, procediendo según el método de la reivindicación 1.

35 Según la presente invención, el fluido uterino, endocervical o transcervical o la sangre materna periférica se procesa en primer lugar mediante una o más etapas de enriquecimiento de las células nucleadas fetales. El método se caracteriza por el uso de un sistema microfluídico que puede seleccionar individualmente, de manera fácilmente automatizable y repetible, células únicas de la muestra enriquecida. Por medio de un sistema microfluídico de aislamiento de células únicas, es posible obtener un conjunto de células fetales con pureza suficiente para realizar un diagnóstico genético.

40 Por dispositivo microfluídico, se quiere decir un dispositivo adecuado para gestionar volúmenes de líquido con un flujo laminar.

Por dispositivo microfluídico, se quiere decir además un dispositivo que tiene al menos una dimensión menor que 1 mm.

45 Por dispositivo que puede seleccionar individualmente células únicas, se quiere decir un dispositivo que puede realizar la selección de una o más células únicas, una cada vez o simultáneamente, basándose en parámetros evaluados individualmente en cada célula.

El análisis genético puede realizarse entonces mediante técnicas tales como PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR), si es necesario usando análisis de las células de la madre para la comparación, FISH, cariotipo o hibridación genómica comparativa (CGH).

50 El uso de un sistema microfluídico ofrece diversas ventajas, incluyendo la posibilidad de disponer de sistemas desechables, sin riesgos de contaminación entre los diferentes análisis o la necesidad del lavado meticuloso del

equipo. Además, el uso de un sistema microfluídico ofrece la posibilidad de disponer de sistemas automáticos o semiautomáticos, caracterizados por un alto nivel de fiabilidad.

Características y ventajas adicionales de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de algunos ejemplos de implementación no limitativos, con referencia a las figuras de los dibujos adjuntos.

5 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un diagrama resumen del método de diagnóstico prenatal no invasivo según la presente invención.

La figura 2 muestra una imagen del chip con aumento 10X con filtro para fluorescencia de DAPI. Pueden observarse tres núcleos, correspondientes a tres células únicas.

10 La figura 3 muestra una imagen del chip con aumento 10X con filtro para fluorescencia de FITC. La zona fotografiada es la misma que la de la figura 2 y pueden observarse dos células positivas para Hb-e y una célula negativa para Hb-e.

15 La figura 4 muestra un electroferograma relativo al análisis del marcador cromosómico AMXY, D21S11 y HPRT. La representación gráfica superior se refiere al análisis realizado con células fetales recuperadas de sangre materna, la representación gráfica inferior se refiere al análisis realizado con células maternas. El gráfico muestra la presencia de los cromosomas sexuales X e Y en el feto y en D21S11 las células fetales tienen un primer alelo heredado de la madre (M) y un segundo alelo diferente (de origen paterno (P)).

20 La figura 5 muestra un electroferograma relativo al análisis de los marcadores cromosómicos D18S391, D13S631 y D21S1411. La representación gráfica superior se refiere al análisis realizado con las células fetales recuperadas de sangre materna, la representación gráfica inferior se refiere al análisis realizado con células maternas. El gráfico muestra para los marcadores D13S631 y D21S1411 la presencia de dos alelos (heterocigoto normal) y puede excluirse la contaminación por células maternas.

25 La figura 6 muestra un electroferograma relativo al análisis del marcador D21S1437 y D21S1446. La representación gráfica superior se refiere al análisis realizado con células fetales recuperadas de sangre materna, la representación gráfica inferior se refiere al análisis realizado con células maternas. El gráfico muestra la presencia de dos alelos (heterocigoto normal) y puede excluirse la contaminación por células maternas.

30 La figura 7 muestra un electroferograma relativo al análisis del marcador D18S535. La representación gráfica superior se refiere al análisis realizado con células fetales recuperadas de sangre materna, la representación gráfica inferior se refiere al análisis realizado con células maternas. El gráfico muestra la presencia de dos alelos de resultado no claro (heterocigoto normal).

La figura 8 muestra un diagrama de flujo de una realización preferida del método según la presente invención.

La figura 9 muestra la tendencia del número de células fetales en una única jaula (NCISCC) según la densidad media de células por jaula (ACPC).

35 La figura 10 muestra esquemáticamente un ejemplo de un dispositivo para implementación del método (o de la parte sustancial y caracterizadora del mismo) según la invención.

Descripción detallada

El objeto de la presente invención es un método para realizar un diagnóstico prenatal no invasivo.

Recogida de muestras transcervicales

40 Las muestras transcervicales (TCC) pueden tomarse de diferentes niveles del útero (hueso externo, parte inferior del conducto cervicouterino, segmento uterino inferior, cavidad intrauterina) por medio de diversas técnicas: aspiración de la mucosidad cervicouterina, hisopo o cepillo para citología, lavado endocervical y lavado intrauterino (IUL).

Enriquecimiento partiendo de sangre periférica

45 La proporción de células fetales puede enriquecerse usando diversos métodos, por ejemplo centrifugación con gradiente de densidad, que consiste en disoluciones tales como Ficoll o Percoll; enriquecimiento mecánico, basado en filtros microfabricados que seleccionan nRBC y vacían la muestra de RBC; enriquecimiento mediante separación

5 dielectroforética por medio de un dispositivo específico, el clasificador de células activadas dielectroforético (DACS); lisis selectiva, por ejemplo lisis selectiva de los eritrocitos sin interés; separación inmunomagnética, por medio de perlas inmunomagnéticas con selección positiva (usando perlas unidas a anticuerpos específicos para la población fetal que va a recuperarse) o selección negativa (reducción de poblaciones celulares sin interés), y en las que los dos tipos de selección pueden acoplarse para aumentar la especificidad del método (como, por ejemplo, en el documento US2006/0051775 - Bianchi); FACS, con células marcadas con anticuerpo fluorescente específico para antígenos fetales.

10 La mayoría de estos métodos también están automatizados y todos los métodos de separación pueden estar precedidos por la separación de las células mononucleadas totales por medio de centrifugación con gradiente de densidad o alternativamente pueden aplicarse con sangre en su totalidad.

En general, el procedimiento se inicia a partir de una dilución, pero no es estrictamente necesario para todas las técnicas.

Otras técnicas de enriquecimiento

15 Una técnica adicional bien conocida por los expertos en la técnica se denomina MACS de Miltenyi Biotech, o Easy-sep de Stem-cell technologies.

20 En resumen, considerando el caso de fluido orgánico que consiste en sangre materna periférica, puede obtenerse el enriquecimiento de la muestra de sangre en la población de células que comprende al menos un tipo de células fetales mediante un procedimiento en fases sucesivas con, por ejemplo, una primera fase en la que se separan las células mononucleadas totales de la muestra materna, diluida previamente en PBS/EDTA por medio de centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Obviamente, como alternativa, podría usarse uno cualquiera de los otros métodos resumidos en la figura 1, por ejemplo enriquecimiento de la muestra materna mediante una selección de células realizada basándose en al menos un parámetro elegido del grupo que consiste en:

- a. densidad;
- b. morfología;
- 25 c. propiedades eléctricas;
- d. propiedades químicas;
- e. propiedades mecánicas;
- f. expresión-de antígenos de superficie;
- g. expresión de antígenos intracitoplasmáticos;
- 30 h. propiedades dieléctricas;
- i. propiedades magnéticas;
- o combinaciones de las mismas.

35 Posteriormente, se obtiene adicionalmente el enriquecimiento de las células fetales por medio de una segunda fase en la que se realiza la selección positiva o negativa de células, por ejemplo que expresan CD71, de las células mononucleadas recuperadas en la primera etapa. Obviamente, la segunda etapa de enriquecimiento puede comprender una selección realizada basándose en al menos una de las siguientes características de la población de células que comprende al menos un tipo de células nucleadas fetales:

- a. expresan el antígeno de superficie CD71 (tal como se ha descrito ya y que representa la forma preferida de la invención);
- 40 b. expresan el antígeno de superficie CD34;
- c. expresan el antígeno de superficie GPA;
- d. no expresan el antígeno de superficie CD14;

e. no expresan el antígeno de superficie CD15;

f. no expresan el antígeno de superficie CD45.

Además, dicha segunda fase de enriquecer la muestra en la población de células que comprende al menos un tipo de células puede realizarse mediante una de las siguientes técnicas:

- 5 a. MACS o clasificador de células activadas magnético;
- b. DACS o clasificador de células activadas dielectroforético;
- c. FACS o Clasificador de células activadas de fluorescencia.

Marcaje de las células fetales

Inmunotinción de trofoblastos

- 10 Si la muestra es una muestra de TCC, antes del marcaje, se incuba la muestra con acetil-cisteína y se agita de manera vigorosa para disolver las agrupaciones y obtener una suspensión de células únicas.

Para la identificación de las células fetales, se usa un marcaje con un anticuerpo específico para las células fetales (que puede discriminarlas de las maternas), procediendo como en la técnica conocida. Los trofoblastos pueden marcarse usando una variedad de anticuerpos dirigidos frente a antígenos específicos:

- 15 HLA-G, NDOG-5, BC1, factor XIII, FDO202N, JunD, Fra2, HASH2 y PP5 (proteína placentaria), específicos para los trofoblastos extravelosos;

FT1.41.1, 103, NDOG-1 y AB-154, específicos para los trofoblastos sincitiales;

CK-7 (citoqueratina-7), CHL1 (CD146), CHL2, H315, HLA-C, aHCG, IGF-II, PAI-1 y p57, expresados en los trofoblastos;

- 20 PLAP (fosfatasa alcalina placentaria), AB-340 y D6, expresados en citotrofoblastos y trofoblastos sincitiales;

tapasina y CAR, específicos para trofoblastos invasivos o extravelosos pero no vellosos;

PLAC1, PLAC4, PLAC8 y PLAC9, específicos de la placenta, en particular de las células del linaje trofoblástico;

PAR-1 (receptor activado por proteasa), expresado en células de la placenta desde la 7ª hasta la 10ª semana de gestación;

- 25 GLUT-12 (proteína transportadora de glucosa), expresada en trofoblastos sincitiales y trofoblastos extravelosos desde la 7ª hasta la 10ª semana de gestación;

NDPK-A (nucleósido difosfato cinasa A), expresada en trofoblastos extravelosos durante los tres primeros meses del embarazo.

Inmunotinción de eritroblastos de muestras de sangre materna periférica

- 30 Para la identificación de las células fetales, se usa un marcaje con un segundo anticuerpo específico para las células fetales (que puede discriminarlas de las maternas), diferente del anticuerpo usado para el enriquecimiento que, tal como se describió anteriormente, no es necesariamente específico para las células fetales.

En este caso, puede usarse lo siguiente:

- anticuerpos que reconocen antígenos de superficie (antígenos de tipo i);

- 35 • antígenos intracelulares (por ejemplo, las cadenas de globina γ o ϵ). En estos casos, las células preferiblemente se fijan y permeabilizan, como en la técnica conocida, para permitir un buen marcaje.

Debe observarse que aunque se conoce a partir de estudios previos el uso del anticuerpo anti-antígeno i para marcar células fetales, dicho anticuerpo se usó directamente en un dispositivo basado en gradiente de densidad. El

marcaje de las células fetales por medio de anticuerpo contra antígeno i precedido por enriquecimiento de las células CD71+ tiene la ventaja de realizar una preselección de las células fetales (muestra enriquecida en eritroblastos fetales) y facilitar la identificación de las células de interés, obteniendo además un marcaje muy sensible y específico.

5 Células ya marcadas

Las células fetales pueden estar ya marcadas si se ha usado en el enriquecimiento un anticuerpo que es específico para las células fetales (que puede discriminarlas de las maternas) y es fluorescente o está conjugado con una perla fluorescente o está conjugado con un anticuerpo fluorescente secundario o terciario. En este caso, la muestra enriquecida puede inyectarse directamente en el dispositivo microfluídico que puede seleccionar células únicas, puesto que ya es posible identificar las células fetales.

10 Aislamiento de células fetales únicas

Posteriormente, la muestra que contiene las células se pone en un dispositivo microfluídico que puede seleccionar individualmente células únicas, de cualquier tipo conocido. Para dicho fin, puede usarse aislamiento dielectroforético (DEPArray, usando por ejemplo las técnicas descritas en el documento PCT/IB2007/000963 o en el documento PCT/IB2007/000751, o [31] y [32]), o trampas optoelectrónicas o aislamiento optoforético o pinzas láser [28-30].

La identificación de las células de interés puede realizarse por ejemplo mediante sensores:

- externos

- ópticos tales como un microscopio de fluorescencia, o también

- internos

20 - ópticos, tal como se ilustra en las patentes PCT/IB2006/000636 y WO2007010367, que describen un método integrado de identificación de las células fluorescentes

- impedanciométricos, tal como se ilustra en las patentes PCT/IB2006/000636 y WO2007010367 para identificar perlas dieléctricas asociadas con células.

Análisis genético

25 Pueden realizarse diversos tipos de análisis con las células fetales recuperadas que permiten la caracterización genética o cromosómica a diferentes niveles de resolución y sensibilidad y según el fin diagnóstico del estudio.

En el caso de trastornos cromosómicos supuestos, puede realizarse el análisis del cariotipo con un método clásico o molecular (FISH) o el estudio de marcadores cromosómicos por medio de QF-PCR. También puede investigarse la adquisición o pérdida de material genético por medio de hibridación genómica comparativa.

30 Ejemplos de realizaciones preferentes de la invención

A modo de ejemplo no limitativo del objeto de la invención, se facilita una realización preferente del método según la presente invención, siguiendo el diagrama de flujo indicado en la figura 8.

Recogida de la muestra

Se toman 10 ml de sangre periférica de una mujer embarazada.

35 Enriquecimiento

La realización preferida de la invención comprende un procedimiento en fases sucesivas que tiene una primera fase en la que se separan las células mononucleadas totales de la muestra materna.

Dicha fase comprende una dilución 1:1 de la sangre materna con PBS, pH 7,2. Entonces se estratifica la muestra diluida en un único gradiente de Ficoll, 1,077 g/ml, y se centrifuga a una velocidad de 300 g durante 30 min. a 22°C. Se recoge el anillo de células que se ha acumulado sobre el Ficoll y se transfiere a un tubo de ensayo estéril.

Según una característica de la presente invención, una parte de la sangre o células mononucleadas no se procesa

adicionalmente y se usa para el análisis del ADN materno.

- 5 Entonces se obtiene adicionalmente el enriquecimiento de las células nucleadas fetales mediante una segunda fase, en la que las células que expresan CD71 se seleccionan positivamente de las células mononucleadas recuperadas en la primera etapa. Se realiza la selección positiva por medio de separación inmunomagnética (MACS - Miltenyi Biotec) con el uso de anticuerpos anti-CD71 conjugados con perlas magnéticas.

Para la separación inmunomagnética, se resuspenden las células en 80 μ l de PBS por cada 10^7 células y luego 20 μ l de anti-CD71. Se añaden microperlas (Miltenyi Biotec) por cada 10^7 células. Después de una incubación de 15 min. a 4°C, se hacen pasar las células a través de una columna conectada a un campo magnético que retiene las células positivas para CD71. Las células retenidas se eluyen entonces de la columna y se usan para la fase posterior.

10 Aislamiento

Las células CD71+ (positivas para CD71) así obtenidas se fijan con formaldehído al 3,7% durante 15 min. a 22°C. Las células fijadas se permeabilizan entonces con una disolución de NP-40 (Sigma Aldrich) al 0,1% en PBS. Se añade un anticuerpo (1 μ g/ml) que reconoce la cadena gamma de la hemoglobina fetal conjugado con el fluorocromo FITC a las células permeabilizadas.

- 15 Según un aspecto importante de la invención, la muestra se somete además a contramarcaje, en combinación, con DAPI (u otro marcador adecuado) para mostrar los núcleos de todas las células.

- 20 Antes de cargarse en el chip para la manipulación dielectroforética y el aislamiento de las células fetales, la muestra experimenta un control de calidad para verificar la intensidad de fluorescencia del marcaje y el contenido celular total. Una parte de la muestra marcada se resuspende en un volumen de tampón específico mínimo útil para la manipulación dielectroforética y se carga en un dispositivo para el control de calidad de la muestra y se examina bajo el microscopio de fluorescencia: se observa la intensidad de fluorescencia de las células en los diversos canales y se realiza un recuento de las células marcadas en DAPI (células nucleadas totales). Si la concentración celular es superior a la concentración óptima para el funcionamiento correcto del dispositivo para el aislamiento de las células únicas, se diluye la muestra para obtener la concentración requerida; si el número total de células es demasiado pequeño como para permitir la recuperación de un número mínimo de células fetales, las células fetales no se recuperan (resultado no claro).

25 Para el cálculo de la concentración óptima de células, se remite a un dispositivo comercial específico (DEPArray™, Silicon Biosystems SpA), documento WO0069565, basado en jaulas de dielectroforesis móviles, en particular el modelo CONV600k que comprende 100.000 jaulas.

- 30 Un método de uso preferente de dicho dispositivo prevé las siguientes etapas:

1. Seleccionar las jaulas que contienen una célula fetal (positiva al marcaje).
2. Si la célula es parte de un grupo, es decir comparte la jaula con otras células no fetales, dividir las células del grupo en jaulas independientes hasta que se aisle la célula fetal en una jaula no compartida con otras células no fetales. Si la célula fetal no se separa de las otras células no fetales, descartarla.

- 35 3. Recuperar todas las células fetales en una única jaula.

Un método de uso preferente alternativo adicional de dicho dispositivo prevé las siguientes etapas:

1. Seleccionar las jaulas que contienen una célula fetal (positiva al marcaje).
2. Si la célula es parte de un grupo, descartarla de la lista de células que van a recuperarse.
3. Recuperar todas las células fetales en una única jaula.

- 40 En este segundo caso, la elección de la densidad media de células por jaula (ACPC) que va a inyectarse en el chip se realiza teniendo en cuenta el número de células totales presentes en la muestra (NCELLSTOT) y el porcentaje esperado de células fetales (PCI). De hecho, cuando aumenta la ACPC, aumenta el número de células fetales presentes en la cámara de manipulación del chip. Sin embargo, disminuye la probabilidad de que cada célula pertenezca a una jaula con una única célula, y el número de células fetales en una única jaula (NCISCC) alcanza por tanto un máximo para $ACPC \sim 1$. Dicho valor es independiente de PCI, y puede definirse un valor normalizado de NCISCC con respecto al máximo teórico para $ACPC=1$, cuya tendencia se muestra en el gráfico de la figura 9. Dicha concentración maximiza el número de células que pueden recuperarse en cada lavado de muestra en la

microcámara de manipulación. Esto es una buena elección: si el número total de células fetales que puede recuperarse es suficiente para el análisis genético posterior.

5 A medida que aumenta la ACPC, existe un aumento monótono creciente en el porcentaje de células que van a descartarse debido al hecho de que comparten la jaula con otras células no fetales, tal como se ilustra en la figura 9 en referencia al valor normalizado con respecto al número de células fetales presentes en la microcámara de manipulación (desecho celular normalizado).

Si el número de células recuperables es inferior al mínimo requerido para el análisis posterior, la muestra puede diluirse y realizarse un mayor número de lavados para recuperar un mayor número de células fetales.

10 El valor óptimo de ACPC para recuperar un número suficiente de células fetales con el menor número de lavados puede calcularse basándose en el análisis estadístico determinado anteriormente, por ejemplo con cálculos basados en el número esperado de células fetales y el número mínimo de células para el análisis genético, identificando por tanto una eficacia de recuperación mínima (razón entre células en una única jaula/células en jaula con otras células) de las células fetales presentes en la muestra. A partir de dicha eficacia, puede deducirse un valor máximo de ACPC, por tanto un número mínimo de lavados para procesar toda la muestra con dicha eficacia de recuperación.

15 La muestra se carga entonces en un chip para el aislamiento de células por medio de jaulas de dielectroforesis móviles (DEPArray™, documento WO0069525, Silicon Biosystems SpA, por ejemplo como parte de un paquete o dispositivo global como el ilustrado esquemáticamente en la figura 10) y experimenta la exploración, identificación y selección, clasificación y recuperación de las células fetales. Las células enjauladas se observan (exploración) automática o manualmente bajo un microscopio con tres canales de fluorescencia diferentes (o en tres longitudes de onda diferentes): en el caso no limitativo descrito en el presente documento, el canal azul permite la verificación de la presencia del núcleo y si es necesario su morfología (por ejemplo, marcaje con DAPI) y el canal verde pone de manifiesto las células que se han marcado con el anticuerpo fetal específico que se conjuga con un fluoróforo que emite en la longitud de onda del verde (por ejemplo, FITC). Según un aspecto de la invención, también se usa un tercer canal, diferente de los dos primeros (por ejemplo, el canal que emite en la longitud de onda del rojo, como para el filtro usado para detectar la fluorescencia de TRITC), y para el que no se ha usado ningún marcador fluorescente; esto permite la identificación de las células autofluorescentes, para las que cualquier signo detectado en los canales verde y de DAPI no sería específico.

20

25

Alternativamente, el tercer canal puede usarse para poner de manifiesto células conjugadas con un anticuerpo unido a un fluoróforo, como por ejemplo CD45, para identificar las células que van a descartarse.

30 La selección de células se realiza, por tanto, seleccionando las jaulas que contienen una única célula nucleada (positiva para DAPI, figura 2), que tienen una fuerte señal de anticuerpo fetal específico (positivo para FITC/Alexa, figura 3), y que tienen una autofluorescencia baja o nula, detectada en otros canales (por ejemplo, canal rojo).

35 Para mejorar adicionalmente la selectividad del método, los marcadores fluorescentes, en particular el marcador fetal, en vez de consistir en simples moléculas fluorescentes, pueden consistir en perlas fluorescentes conjugadas con anticuerpo que pueden reconocer las células de interés, en este caso, las células fetales.

Las células se recuperan en unos pocos mililitros (< 40 microlitros) en un tubo de PVC de 0,2 mililitros.

Análisis genético

40 A partir de dichas células así obtenidas, se extrae el ADN que se amplifica y se analiza para determinar la presencia de aneuploidías cromosómicas, preferiblemente operando en el mismo dispositivo microfluídico que el usado para la selección y, si es necesario, ya usado previamente para al menos parte del proceso de enriquecimiento (por ejemplo en el caso de uso de la tecnología DACS); en este caso, el dispositivo puede asemejarse al ilustrado en la figura 10.

45 El equipo contiene una disposición de electrodos como en la técnica conocida, pero se caracteriza por una microcámara principal (CHM) y una pluralidad de microcámaras secundarias (CHJ), todas delimitadas en al menos un lado por un único chip o por una pluralidad de chips separados, portando una disposición de electrodos que pueden activarse. La microcámara principal puede llenarse con una muestra que comprende al menos una célula mediante las entradas (IM1) y salidas (OM1) relativas. Cada microcámara secundaria (CHJ) es preferiblemente de dimensiones sustancialmente mayores pero comparables a las de una célula. Preferiblemente cada microcámara secundaria se conecta a la microcámara principal mediante un canal de configuración (longitud y/o forma) suficiente para evitar (impedir o al menos limitar) la dispersión de la muestra por difusión y la contaminación hacia otras microcámaras, en el tiempo necesario para el análisis. Según el ejemplo ilustrado, hay una pluralidad de microcámaras secundarias para la lisis conectadas a un canal para la electroforesis capilar en chip, por ejemplo con unión cruzada. Alternativamente, puede proporcionarse una serie de canales para la electroforesis capilar con unión en doble T, según la técnica conocida. Opcionalmente, en el extremo del canal para la electroforesis capilar, hay un

50

sensor integrado, del tipo impedanciométrico y/u óptico, que puede producir un electroferograma basándose en el tiempo de migración de los compuestos analizados desde la intersección (cruz o doble T) hasta el propio sensor. Según la figura 10, en particular, cada microcámara de la pluralidad de microcámaras se conecta a un capilar para la electroforesis (CAPJ) mediante una salida fluidica (OJ) de cada microcámara secundaria.

5 La extracción del ADN de las células fetales recuperadas se realiza mediante termólisis alcalina.

La determinación de alteraciones cromosómicas se realiza mediante análisis de la STR (repetición corta en tándem) o microsatélites por medio de QF-PCR. La tecnología de electroforesis capilar por fluorescencia permite el análisis simultáneo de varias STR mediante la elección apropiada de fragmentos de ADN marcados con diferentes moléculas fluorescentes.

10 Al menos tres STR diferentes, con alta frecuencia de heterocigosis en la población, de cada uno de los cromosomas 13, 18 y 21 y tres marcadores de los cromosomas sexuales se amplifican en PCR múltiplex. En el caso de un resultado que no es claro, por ejemplo debido a la presencia de STR en homocigosis, se amplifica una STR adicional del mismo cromosoma. Las STR analizadas son: D21S11, 21S1410, D21S1411, D21S1412, D21S1435 y D21S1446 para el análisis del cromosoma 21; D13S631, D13S634, D13S258, D13S305 y D13S742 para el cromosoma 13; D18S535, D18S386, D18S391, D18S858 y D18S51 para el cromosoma 18; para el análisis de los cromosomas sexuales, se analizan los marcadores AMXY y SRY, y la STR X22, DXYS218, DXS6803, DXS6809, DXS8377, HPRT y SBMA.

20 En paralelo a la amplificación del ADN de las células fetales, se analiza el ADN materno para reconocer, según un aspecto de la invención, la presencia de posible contaminación materna de las células fetales o una posible contaminación externa de la QF-PCR (figuras 4-7).

25 En los electroferogramas, obtenidos a partir de la electroforesis capilar del producto de PCR con el secuenciador automático (por ejemplo con ABI prism 310), se analizan las áreas y las dimensiones de los picos correspondientes a los diversos alelos de los microsatélites amplificados. El análisis simultáneo del ADN materno puede ayudar como control para interpretar el resultado del análisis genético, ayudando a identificar posibles casos de contaminaciones de laboratorio y contaminación de las células fetales recuperadas con células maternas.

La fase de análisis genético también puede realizarse, según una posible variación de la invención, por medio del cariotipo, en cuyo caso la fase de enriquecimiento de al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células nucleadas fetales comprende además las fases de:

I. bloquear las células en metafase.

30 Después de detener las células en metafase, se realizan la fijación y permeabilización para la identificación de las células fetales por medio de un anticuerpo intracitoplasmático.

Bibliografía

35 [1] van Zwieten MC, Willems DL, Litjens LL, Schuring-Blom HG, Leschot N. How unexpected are unexpected findings in prenatal cytogenetic diagnosis? A literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 May 1;120(1):15-21. Review.

[2] Nicolini U, Lalatta F, Natacci F, Curcio C, Bui TH. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of foetal aneuploidies: time for reconsideration. *Hum Reprod Update.* 2004 Nov-Dec;10(6):541-8. Review.

[3] Leung WC, Lau ET, Lao TT, Tang MH. Rapid aneuploidy screening (FISH or QF-PCR): the changing scene in prenatal diagnosis? *Expert Rev Mol Diagn.* 2004 May;4(3):333-7. Review.

40 [4] Hulten MA, Dhanjal S, Pertl B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction.* 2003 Sep;126(3):279-97. Review.

[5] Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn.* 1997 Dec;17(13):1299-311. Review.

45 [6] Adinolfi M, Sherlock J. First trimester prenatal diagnosis using transcervical cells: an evaluation. *Hum Reprod Update.* 1997 Jul-Aug;3(4):383-92. Review

[7] Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, Dukes KA, Sullivan LM, Klinger KW,

- Bischoff FZ, Hahn S, Johnson KL, Lewis D, Wapner RJ, de la Cruz F. Foetal gender and aneuploidy detection using foetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Foetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn.* 2002 Jul;22(7):609-15.
- [8] Shettles, LB (1971) Use of the Y chromosome in prenatal sex determination. *Nature*, 230, 52.
- 5 [9] Adinolfi, M, Davies, A, Sharif, S *et al.* (1993) Detection of trisomy 18 and Y-derived sequences in foetal nucleated cells obtained by transcervical flushing, *Lancet*, 342, 403-404.
- [10] Adinolfi, M and Sherlock, J (1997) First trimester prenatal diagnosis using transcervical cells: an evaluation, *Human Reproduction Update*, 3 (4), 383-392.
- 10 [11] Miller, D, Briggs, J, S.Rahman, M, *et al.* (1999) Transcervical recovery of foetal cells from the lower uterine pole: reliability of recovery and histological/immunocytochemical analysis of recovered cell populations, *Human Reproduction*, 14 (2), 521-531
- [12] Bussani, C, Cioni, R, Scarselli B, *et al.* (2002) Strategies for the isolation and detection of foetal cells in transcervical samples, *Prenatal Diagnosis*, 22, 1098-1101.
- 15 [13] Bussani, C, Scarselli, B, Cioni, R, *et al.* Use of the quantitative fluorescent-PCR assay in the study of foetal DNA from micromanipulated transcervical samples, *Mol Diagn*, 8 (4), 259-263
- [14] Wang JY, Zhen DK, Falco VM, Farina A, Zheng YL, Delli-Bovi LC, Bianchi DW. Foetal nucleated erythrocyte recovery: fluorescence activated cell sorting-based positive selection using anti-gamma globin versus magnetic activated cell sorting using anti-CD45 depletion and anti-gamma globin positive selection. *Cytometry*. 2000 Mar 1;39(3):224-30:
- 20 [15] Samura O, Sekizawa A, Zhen DK, Falco VM, Bianchi DW. Comparison of foetal cell recovery from maternal blood using a high density gradient for the initial separation step: 1.090 versus 1.119 g/ml. *Prenat Diagn.* 2000 Apr;20(4):281-6.
- [16] Sekizawa A, Farina A, Zhen DK, Wang JY, Falco VM, Elmes S, Bianchi DW. Improvement of foetal cell "recovery" from maternal blood: suitable density gradient for FACS separation. *Foetal Diagn Ther.* 1999 Jul-Aug; 14(4):229-33.
- 25 [17] Sekizawa A, Samura: O Zhen DK, Falco V, Bianchi DW. Foetal cell recycling: diagnosis of gender and RhD genotype in the same foetal cell retrieved from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Nov;181(5 Pt,1):1237-42.
- [18] Zheng YL, Zhen DK; DeMaria MA, Berry SM, Wapner RJ, Evans MI, Copeland D, Williams JM, Bianchi DW. Search for the optimal foetal cell antibody: results of immunophenotyping studies using flow cytometry. *Hum Genet.* 1997 Jul;100(1):35 - 42.
- 30 [19] Geifman-Holtzman O, Bernstein IM, Berry SM, Holtzman EJ, Vadnais TJ, DeMaria MA, Bianchi DW. Foetal RhD genotyping in foetal cells flow sorted from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol.* 1996 Mar;174(3):818-22.
- [20] Bianchi DW, Klinger KW, Vadnais TJ, Demaria, MA, Shuber AP, Skoletsky J, Midura P, Diriso M, Pelletier C, Genova M, Erikson MS, Williams JM. Development of a model system to compare cell separation methods for the isolation of foetal cells from maternal blood. *Prenat Diagn.* 1996 Apr;16(4): 289-98.
- 35 [21] DeMaria MA, Zheng YL, Zhen D, Weinschenk NM, Vadnais TJ, Bianchi DW. Improved foetal nucleated erythrocyte sorting purity using intracellular antifoetal hemoglobin and Hoechst 33342. *Cytometry*. 1996 Sep 1;25(1):37-45.
- [22] Zheng YL, Craigo SD, Price CM, Bianchi DW. Demonstration of spontaneously dividing male foetal cells in maternal blood by negative magnetic cell sorting and fish. *Prenat Diagn.* 1995 Jun;15(6): 573-8.
- 40 [23] Zheng YL, Demaria M, Zhen D, Vadnais TJ, Bianchi DW. Flow sorting of foetal erythroblasts using intracytoplasmic antifoetal haemoglobin: preliminary observations on maternal samples. *Prenat Diagn.* 1995 Oct;15(10):897-905.
- [24] Bianchi DW, Yih MC, Zickwolf GK, Flint AF. Transferrin receptor (CD71) expression on circulating mononuclear cells during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1994 Jan;170(1 Pt 1):202-6.
- 45

- [25] Bianchi DW, Shuber AP, DeMaria MA, Fougner AC, Klinger KW. Foetal cells in maternal blood: determination of purity and yield by quantitative polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol.* 1994 Oct;171(4):922-6.
- [26] Bianchi DW, Mahr A, Zickwolf GK, Houseal TW, Flint AF, Klinger KW. Detection of foetal cells with 47,XY,+21 karyotype in maternal peripheral blood. *Hum Genet.* 1992 Dec;90(4):368-70.
- 5 [27] Bianchi DW, Stewart JE, Garber MF, Lucotte G, Flint AF. Possible effect of gestational age on the detection of foetal nucleated erythrocytes in maternal blood. *Prenat Diagn.* 1991 Aug;11(8):523-8.
- [28] Reichle C, Sparbier K, Muller T, Schnelle T, Walden P and Fuhr G, *Electrophoresis*, 2001; 22:272-82.
- [29] Fiedler S, Shirley SG, Schnelle T and Fuhr G, *Anal. Chem.* 1998; 70:1909-15.
- [30] Enger J, Goksor M, Ramser K, Hagberg P and Hantstorp D, *Lab Chip*, 2004; 4:196-200.
- 10 [31] Manaresi N, Romani A, Medoro G, Altomare L, Leonardi A, Tartagni M and Guerrieri R, *IEEE J. Solid-State Circuits*, 2003; 38:2297-2305.
- [32] Romani A, Manaresi N, Marzocchi L, Medoro G, Leonardi A, Altomare L, Tartagni M and Guerrieri R, *Proceedings of the International Solid State Circuit Conference*, 2004; 1:224-225.

REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico prenatal no invasivo que comprende las siguientes etapas de:
 - a. obtener una muestra de un fluido orgánico que tiene una alta probabilidad de contener células nucleadas fetales de una mujer embarazada;
 - 5 b. enriquecer dicha muestra de fluido orgánico en al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células nucleadas fetales;
 - c. aislar al menos una célula de entre dicho al menos un tipo de células nucleadas fetales;
 - d. realizar un análisis genético con dicha al menos una célula aislada de entre dicho al menos un tipo de células nucleadas fetales con el fin de poner de manifiesto al menos una característica genética de dicha al menos una célula nucleada fetal adecuada para permitir dicho diagnóstico;
 - 10 caracterizado porque
 - i) el método comprende una fase de marcaje de las células fetales con un anticuerpo específico para las células fetales adecuado para discriminarlas de las maternas; y
 - 15 ii) dicha etapa de aislar al menos una célula de entre dicho al menos un tipo de células nucleadas fetales se realiza seleccionando individualmente células únicas en un dispositivo microfluídico diseñado para dicho fin; y
 - iii) dicha etapa de aislar al menos una célula fetal se realiza seleccionando individualmente células únicas presentes en dicho dispositivo microfluídico, marcadas previamente con dicho anticuerpo específico.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha etapa de aislar al menos una célula de entre dicho al menos un tipo de células nucleadas fetales se realiza capturando células únicas, preferiblemente cada una en un sitio específico de una pluralidad de sitios de dicho dispositivo microfluídico situados en el dispositivo microfluídico según una disposición, y posteriormente seleccionar células únicas de entre las células capturadas, basándose en al menos un parámetro que puede detectarse por medio de un sensor interno o externo al dispositivo microfluídico.
- 25 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque dicha etapa de enriquecer dicha muestra de dicho fluido orgánico comprende una selección de células realizada basándose en al menos un parámetro elegido del grupo que consiste en:
 - a. densidad;
 - b. morfología;
 - 30 c. propiedades eléctricas;
 - d. propiedades químicas;
 - e. propiedades mecánicas;
 - f. expresión de antígenos de superficie;
 - g. expresión de antígenos intracitoplasmáticos;
 - 35 h. propiedades dieléctricas;
 - i. propiedades magnéticas;
 - o combinaciones de las mismas.
- 40 4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque dicha etapa de enriquecer dicha muestra de dicho fluido orgánico en al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células nucleadas fetales comprende la etapa de tratar dicha muestra de dicho fluido orgánico con el fin de separar las células

nucleadas y por consiguiente enriquecerlo en células nucleadas.

5. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque dicha etapa de tratar la muestra de dicho fluido orgánico con el fin de separar las células nucleadas y por consiguiente enriquecerlo en células nucleadas comprende la etapa de centrifugar dicha muestra de dicho fluido orgánico en gradiente de densidad.
- 5 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha etapa de enriquecimiento comprende una selección realizada basándose en al menos una de las siguientes características de dicha población de células que comprende al menos un tipo de células nucleadas fetales:
 - a. expresan el antígeno de superficie CD71;
 - b. expresan el antígeno de superficie CD34;
 - 10 c. expresan el antígeno de superficie GPA;
 - d. no expresan el antígeno de superficie CD14;
 - e. no expresan el antígeno de superficie CD15;
 - f. no expresan el antígeno de superficie CD45.
- 15 7. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende la etapa de diluir dicha muestra de dicho fluido orgánico después de dicha etapa de enriquecimiento y antes de dicha etapa de aislamiento de al menos una célula de entre dicho al menos un tipo de células nucleadas fetales; dicha dilución se realiza basándose en un recuento del número de células nucleadas presentes en una parte de volumen preestablecido de dicha muestra, que se separa de la muestra de dicho fluido orgánico inmediatamente después de dicha etapa de enriquecimiento.
- 20 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque al menos una o ambas de dichas etapas de enriquecimiento y realización de un análisis genético se llevan a cabo en combinación con dicha etapa de aislamiento dentro de dicho dispositivo microfluidico usado para realizar la etapa de aislamiento.
- 25 9. Método según la reivindicación 8, caracterizado porque el dispositivo microfluidico usado está dotado de una pluralidad de diferentes cámaras, separadas unas de otras y conectadas hidráulicamente, delimitadas en al menos un lado por un único chip o por una pluralidad de chips separados, portando una disposición de electrodos que pueden activarse.
- 30 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la fase de marcaje de las células fetales con un anticuerpo específico para las células fetales adecuado para discriminarlas de las maternas se realiza preferiblemente usando una variedad de anticuerpos dirigidos frente a un antígeno específico seleccionado del grupo que consiste en:
 - anticuerpos que reconocen antígenos de trofoblastos fetales tales como: HLA-G
 - anticuerpos que reconocen antígenos de superficie fetales tales como: antígenos i
 - anticuerpos que reconocen antígenos intracelulares fetales tales como: cadenas de hemoglobina γ y ϵ .
- 35 11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho anticuerpo específico para las células fetales adecuado para discriminarlas de las maternas es un anticuerpo fluorescente.
12. Método según una de las reivindicaciones 10 u 11, caracterizado porque dicho anticuerpo específico para las células fetales adecuado para discriminarlas de las maternas se conjuga con una perla fluorescente.
- 40 13. Método según una de las reivindicaciones 10 a 12, en el que dicha muestra de un fluido orgánico es una muestra de sangre que contiene al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células nucleadas fetales, caracterizado porque comprende la fase de marcaje con un primer marcador específico para el núcleo celular, de células nucleadas de dicha muestra de sangre, y marcaje con un segundo marcador, distinguible del primero, de al menos dicha población de células que comprende al menos un tipo de células nucleadas fetales, en el que dicho segundo marcador es dicho anticuerpo específico para las células fetales adecuado para discriminarlas de las maternas, con el fin de seleccionar
- 45

en dicha etapa de aislar al menos una célula fetal, sólo células únicas que ponen de manifiesto la presencia de ambos de dichos marcadores primero y segundo.

- 5 14. Método según la reivindicación 13, caracterizado porque ambos de dichos marcadores primero y segundo son marcadores fluorescentes que tienen emisión en una longitud de onda primera y segunda respectivamente, diferentes entre sí, preferiblemente en la longitud de onda del azul y el verde respectivamente.
- 10 15. Método según la reivindicación 14, caracterizado porque dicha fase de seleccionar individualmente células únicas en dicha etapa de aislar al menos una célula fetal se realiza detectando también la emisión de una tercera longitud de onda, preferiblemente en la longitud de onda del rojo, que puede generarse mediante autofluorescencia por dichas células en dicha muestra de dicho fluido orgánico, con el fin de seleccionar sólo células que emiten en ambas de dichas longitudes de onda primera y segunda pero que, al mismo tiempo, no emiten en dicha tercera longitud de onda.
- 15 16. Método según una de las reivindicaciones 10 a 15, caracterizado porque comprende, después del marcaje las células, una fase de fijación y permeabilización para la identificación de las células fetales por medio de un anticuerpo intracitoplasmático.
17. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha fase de análisis genético se realiza por medio de QF-PCR y comprende una fase de comparación entre información genética que lleva dicha al menos una célula nucleada fetal y al menos una célula nucleada materna.
- 20 18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha etapa de enriquecer dicha muestra de dicho fluido orgánico en al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células nucleadas fetales comprende las fases de poner en un cultivo dicha muestra de dicho fluido orgánico enriquecido en dicha al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células nucleadas fetales y posteriormente repetir con dicha muestra una fase de enriquecimiento.
- 25 19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha muestra de dicho fluido orgánico contiene células seleccionadas del grupo que consiste en: células uterinas, transcervicales o endocervicales o sangre materna periférica.
20. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho dispositivo microfluídico para la selección de células únicas es un dispositivo desechable.

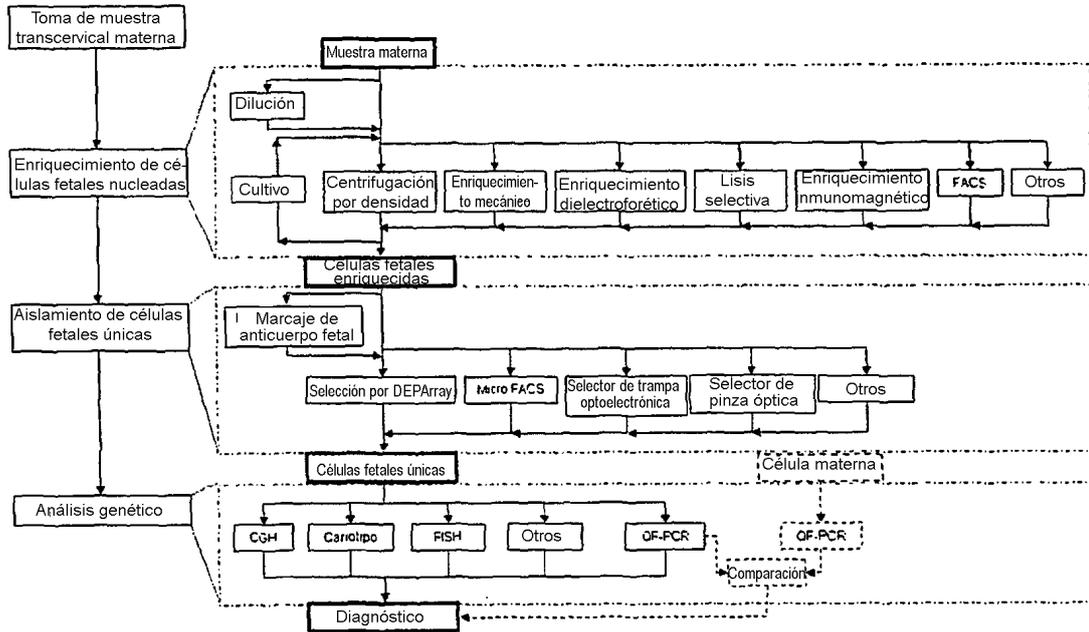


Fig. 1

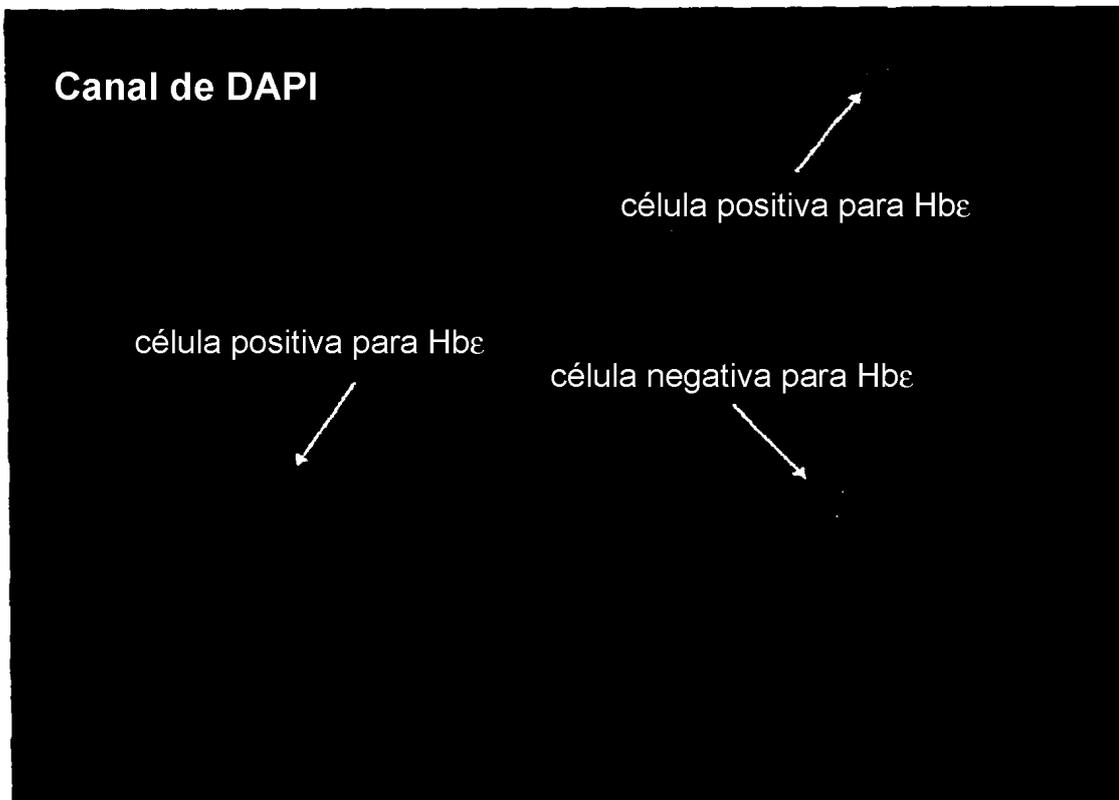


Fig. 2

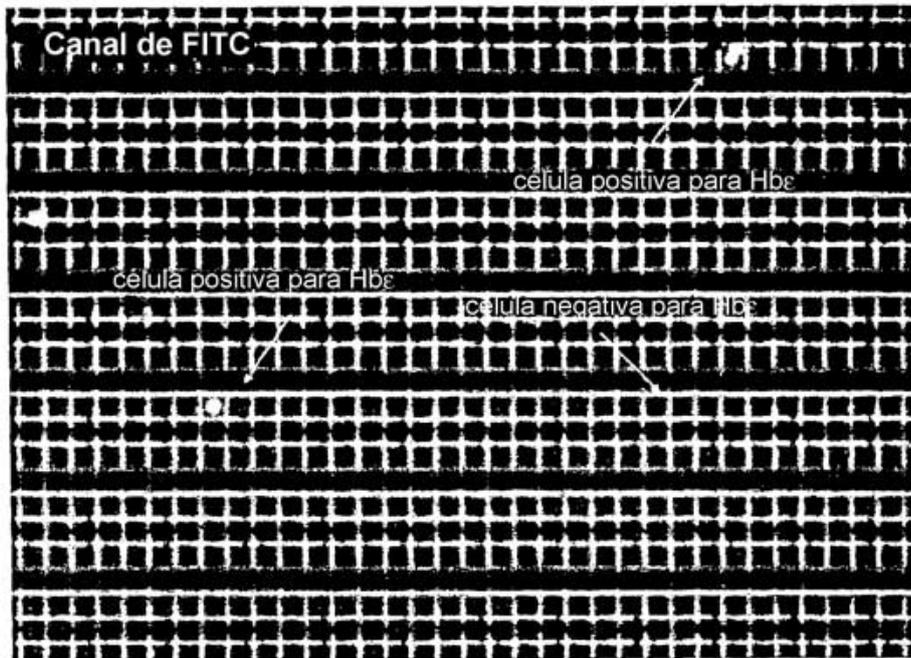


Fig. 3

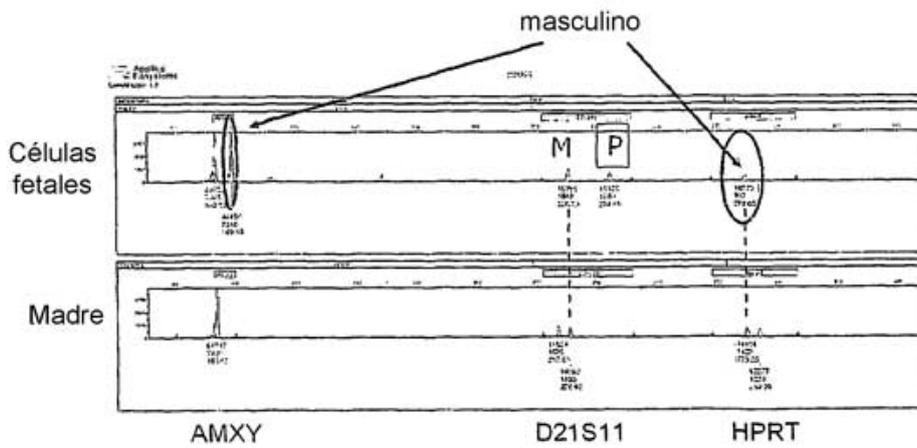


Fig. 4

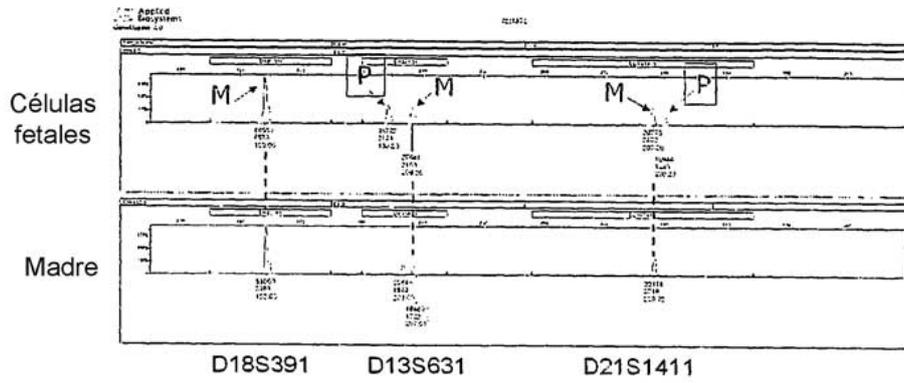


Fig. 5

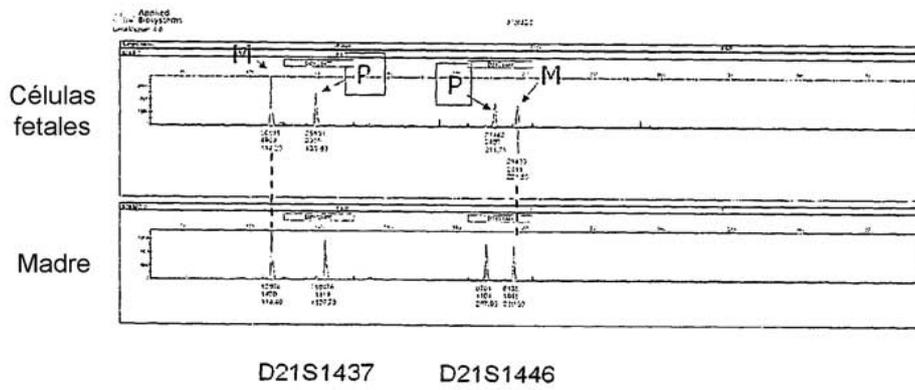


Fig. 6

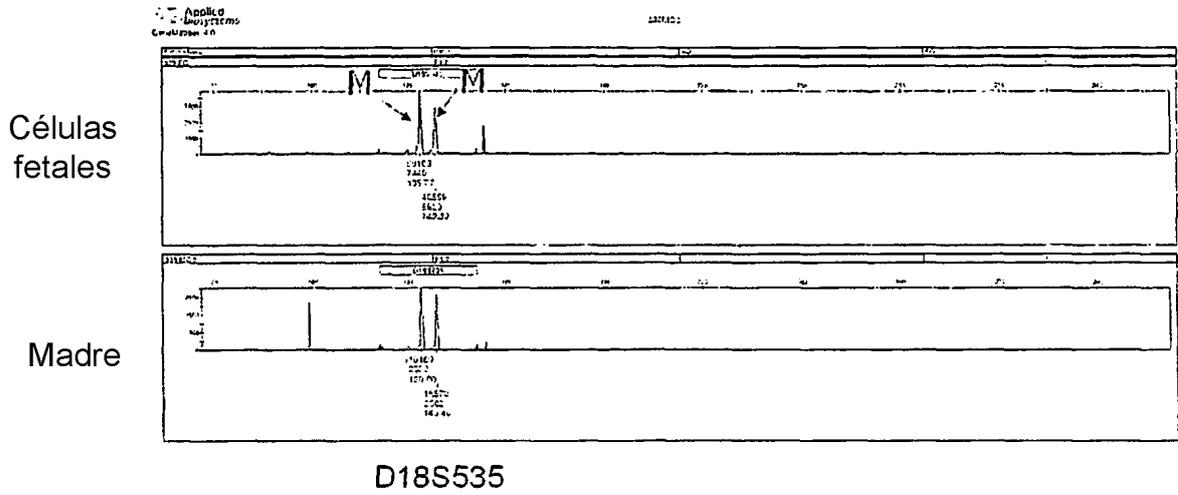


Fig. 7

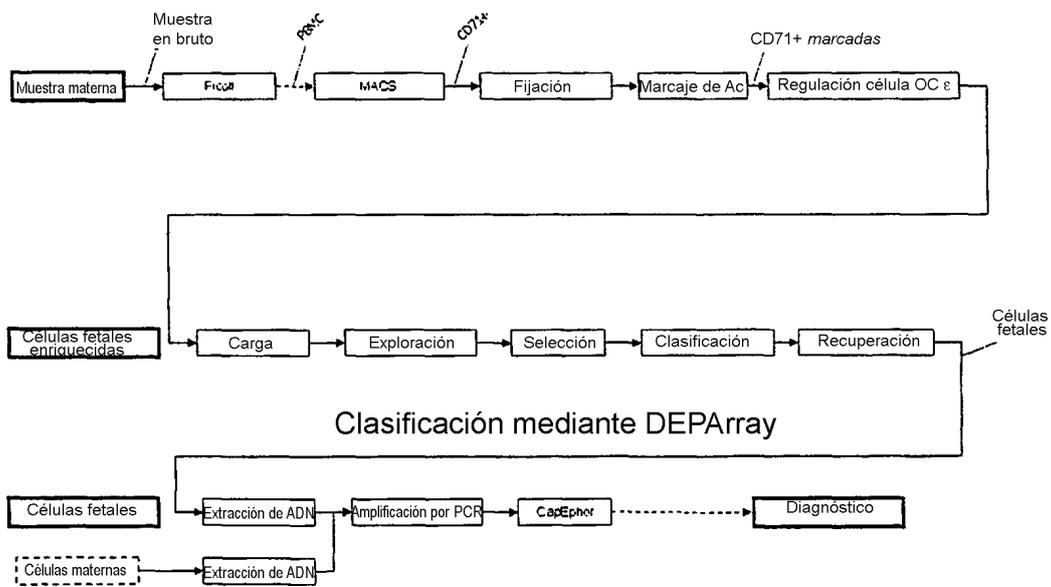


Fig. 8

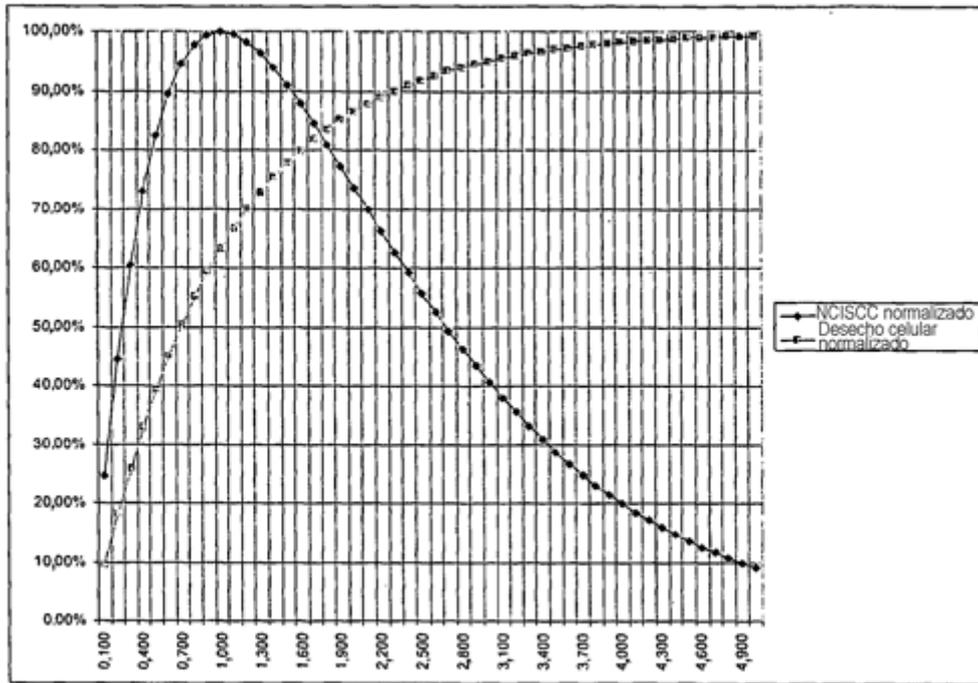


Fig. 9

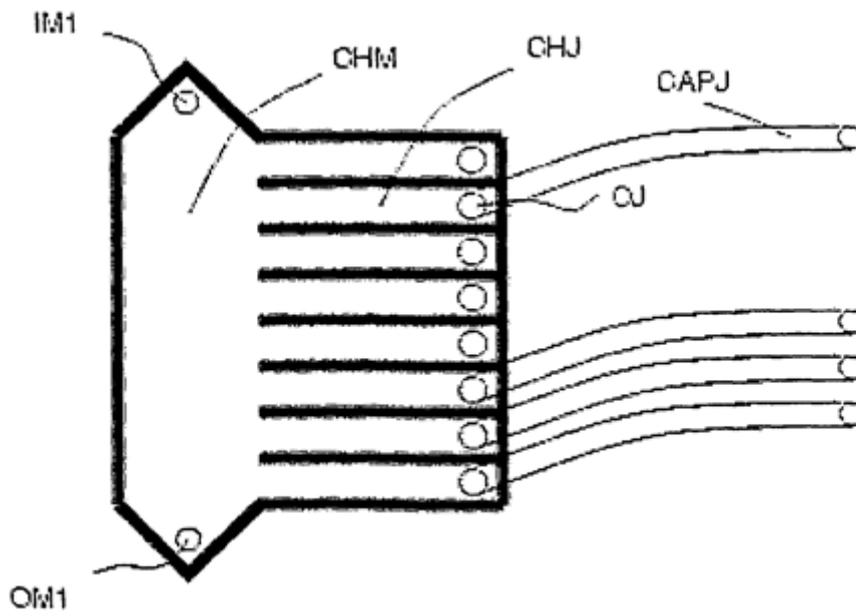


Fig. 10