(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 550 590**

(51) Int. CI.:

G01N 1/14 (2006.01)
A61B 10/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2007 E 07866800 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2220474**

(54) Título: **Método de recogida y conservación de fluidos y/o materiales, en particular de fluidos orgánicos y/o materiales que contienen citoblastos, y dispositivo empleable en tal método**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.11.2015

(73) Titular/es:

BIOCELL CENTER S.P.A. (100.0%)
VIALE STELVIO 125
21052 BUSTO ARSIZIO, IT

(72) Inventor/es:

MAGGI, FEDERICO;
REGUZZONI, MARCO, GIOVANNI;
SIMONI, GIUSEPPE y
MACCAGNAN, SIMONE

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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 de recogida y conservación de fluidos y/o materiales, en particular de fluidos orgánicos y/o materiales que contienen citoblastos, y dispositivo empleable en tal método

La presente invención se refiere a un método de recogida y conservación de fluidos y/o materiales que contienen citoblastos, siendo tal método empleable en diferentes campos de operación, tales como el muestreo y la conservación de fluidos orgánicos en el ámbito clínico/de laboratorio.

Se sabe que en diferentes campos de producción se hace necesario el muestreo de una sustancia fluida de un volumen cerrado dado, como puede ocurrir en ejemplos médicos prenatales, y también en cuanto a lo que se refiere al trabajo de algunos circuitos impresos electrónicos.

En el primero de los dos campos de aplicación mencionados anteriormente a modo de ejemplo, aunque están siendo realizadas pruebas tales como la amniocentesis y CVS (es decir, muestreo de vellosidades coriónicas), se contempla una primera etapa en particular en la que un primer muestreo de líquido amniótico (aproximadamente 3 cm^3) se lleva a cabo por medio de una jeringa adecuadamente dispuesta de manera que perfore la pared abdominal y la placenta de la mujer embarazada de la manera menos invasiva posible; posteriormente, mientras que la aguja se mantiene implantada durante el primer muestreo, el cuerpo de la jeringa se cambia con el fin de obtener un segundo muestreo más voluminoso (aproximadamente 10 cm^3 del líquido amniótico).

Generalmente, el líquido tomado durante el primer muestreo se desecha, esencialmente debido al hecho de que la inserción de la aguja a través de la pared abdominal y la placenta da lugar a la creación de un residuo sustancialmente cilíndrico del tejido orgánico de la madre (que en el campo particular normalmente se denomina “frústula” o “fragmento”), que obviamente interfiere con la calidad de la muestra de fluido y/o material tomado.

Sin embargo, debe señalarse que actualmente la técnica conocida no contempla ningún método que implique el uso a largo plazo de líquido amniótico o vellosidades coriónicas, sobre todo a propósito de la posibilidad de conservar, sacar y posteriormente manipular los citoblastos que pueden encontrarse suspensos en él.

Por el contrario, el segundo campo de aplicación mencionado anteriormente implica un método particular de imprimir circuitos electrónicos en los que se usa un gel particular que cubre la placa en trabajo (que a su vez se “mapea” por medio de un haz láser o similares); en este método, las características fisicoquímicas del gel afectan adversamente la conductividad de los circuitos electrónicos impresos por medio del haz láser (que pasa a través del propio gel) y es, por tanto, esencial que se lleven a cabo periódicamente muestras de gel con el fin de comprobar la composición de la misma.

En los ejemplos de aplicación brevemente descritos anteriormente (pero también en muchos otros campos de operación) es, por tanto, necesario operar sobre una sustancia dada que puede estar en el estado fluido y está adaptada para ser analizada/examinada; al mismo tiempo, esta sustancia va a mantenerse en un volumen de operación que debe aislarse en la medida de lo posible de agentes externos (atmósfera, entornos no estériles, sustancias extrañas, etc.).

La técnica conocida que se acaba de describir, a pesar de ser bastante ampliamente extendida, tiene algunos inconvenientes.

Primero, la ejecución de métodos conocidos para el muestreo de fluidos y/o materiales (de naturaleza orgánica o no orgánica) está altamente expuesta a riesgos de contaminación de las muestras tomadas, con todas las consecuencias negativas resultantes de la misma.

Además, refiriéndose en particular a fluidos orgánicos y/o materiales que contienen citoblastos, debe señalarse que la implementación de un método que permite una recogida y conservación eficaz y precisa de los mismos es hasta ahora desconocida, ni se sabe que sea un método que pueda asegurar las condiciones de sellado hermético y de esterilidad necesarias (o en cualquier caso las condiciones de máxima separación de agentes ambientales no deseables de naturaleza macro- o microscópica) para poner en práctica las técnicas de “trabajo” y manipulación que pueden (o podrían en el futuro) aplicarse a los propios citoblastos.

Además, con el uso de jeringas comunes, se requiere que el líquido recogido sea vertido de la jeringa verdadera en un recipiente adecuado para la almacenamiento y/o posterior análisis; sin embargo, esta transferencia intermedia puede exponer la muestra recogida a un contacto no deseable con el entorno de alrededor que puede conducir a contaminación y/o errores en el análisis.

Este inconveniente es particularmente grave en el campo clínico, ya que la posibilidad de romper el aislamiento entre el volumen de recogida de fluido y el entorno de alrededor puede producir la entrada de agentes patógenos en el fluido muestreado, pero sobre todo en el cuerpo del paciente; en el caso de pruebas prenatales, las

consecuencias pueden ser doblemente adversas, ya que pueden surgir patologías obviamente posibles tanto para la mujer embarazada como para el feto nonato.

Por otra parte, si se necesita conservación a largo plazo del fluido tomado, y en particular si se requiere la adición de sustancias conservantes adecuadas al fluido, una vez más las jeringas del tipo convencional no son capaces de llevar a cabo esta operación sin exponer la muestra tomada al entorno externo (que implica exponer el fluido a riesgos de contaminación). Los documentos US 5000192, WO 90/13261 muestran ejemplos de dispositivos de muestreo para líquido amniótico.

En vista de lo anterior, la presente invención tiene como objetivo concebir un proceso que permita muestrear volúmenes de fluido y/o material muy precisos de una manera completamente segura (con relación a la contaminación externa) y más rápidamente que con métodos tradicionales.

Todavía más generalmente, la presente invención tiene como objetivo concebir un método que pueda muestrear y conservar fluidos orgánicos (tales como, por ejemplo, el líquido amniótico, y/o el material obtenido cuando se realiza un procedimiento de CVS) que contienen citoblastos, de manera que sea posible trabajar en los citoblastos contenidos en su interior y en un estado de conservación, incluso después de un periodo de almacenamiento indefinido.

Todavía con relación al método, la presente invención desea poner a disposición un proceso que permita la posible mezcla de sustancias conservantes con los fluidos muestreados y/o material, en un corto periodo de tiempo y con la mayor fiabilidad y exactitud (obviamente mientras que se observa completamente el requisito de aislarlos del entorno externo también durante la etapa de añadir el conservante).

Los objetivos anteriores y adicionales se logran por un método de recogida y conservación de fluidos y/o materiales, en particular fluidos orgánicos y/o materiales que contienen citoblastos, además de por un dispositivo empleable en un método tal, según la presente invención, que tiene las características mostradas en las reivindicaciones adjuntas y en lo sucesivo ilustradas en una realización de la misma dada a modo de ejemplo no limitante.

Por tanto, desde el punto de visa de la operación, la presente invención contempla la implementación de un método de recogida y conservación de un fluido y/o un material (que puede ser de naturaleza orgánica, como en la realización del método descrito después, y que preferentemente contendrá una cierta cantidad de citoblastos), que principalmente (pero no exclusivamente) comprende las siguientes etapas:

- en primer lugar, se determina un volumen de muestreo, que preferentemente se cerrará y/o separará del entorno de alrededor (tal como placenta de una mujer embarazada, o el interior de una botella de vino en maduración, etc.);
- una vez determinado el volumen de muestreo sobre el que operar, se toma una cantidad predeterminada de fluido y/o material de este volumen de muestreo; y
- esta cantidad predeterminada de fluido y/o material se confina en un volumen de recogida.

Ventajosamente, la determinación de la cantidad de fluido y/o material y la confinación de tal cantidad en el volumen de muestreo se llevan a cabo simultáneamente, y además, estas dos etapas de operación son contemporáneas con una etapa de mantener el aislamiento hidráulico y/o neumático y/o microbiológico entre el volumen de muestreo y el volumen de recogida.

En este momento, se apreciará que existe una diferencia entre el método de la invención y el método de la técnica conocida; en realidad, mientras que en los métodos conocidos siempre hay un momento en el que el fluido muestreado y/o material en realidad se pone en contacto con el entorno externo al volumen de recogida (pensemos en el momento de cambio de aguja en los procedimientos de amniocentesis llevados a cabo de una manera tradicional o en cualquier caso el momento en el que la sonda de muestreo se extrae del volumen de recogida en otros campos), según el presente proceso, no solo se garantiza una separación perfecta en cualquier momento entre el fluido muestreado y/o material y el fluido y/o material que todavía queda en el volumen de muestreo, sino que al mismo tiempo se garantiza una separación permanente y continua con el tiempo entre el entorno externo y la cantidad de fluido muestreado y/o material, tanto durante el verdadero muestreo como durante las posteriores etapas de operación que implican el fluido muestreado y/o material.

El método según la invención es particularmente apreciable en el campo clínico, en el que, por ejemplo, es posible operar sobre el líquido amniótico o, por tanto, si fuera necesario, sobre una muestra orgánica que comprende una cantidad predeterminada de vellosidades coriónicas; este método puede usarse además tanto en la amniocentesis tradicional y/u operaciones de CVS como en un procedimiento más complejo para la extracción y conservación del líquido amniótico (que a su vez se correlaciona con un proceso de conservación y posible re-uso posterior de los citoblastos contenidos dentro del líquido amniótico y/o las vellosidades coriónicas).

En la última aplicación particular mencionada, la determinación del volumen de muestreo comprende una sub-etapa de controlar la posición del feto y/o la posición de la placenta; además, todavía a los objetivos de una correcta ejecución del proceso (y por los motivos conectados con el control de la salud tanto de la mujer embarazada como del feto), se proporciona una etapa para el control de un número predeterminado de parámetros físico-biológicos del feto y/o la mujer embarazada.

Con relación a la operación, es, por tanto, posible contemplar una etapa de tomar una muestra de fluido adicional y/o material.

Para los objetivos de la presente invención es importante enfatizar que el mantenimiento del sellado hermético y/o aislamiento entre el volumen de muestreo y el entorno externo se garantiza debido a la presencia de medios de aislamiento adecuados que empiezan automáticamente e instantáneamente la operación en el momento de la separación.

El método aquí anteriormente descrito puede integrarse con una etapa de almacenamiento y conservación del fluido y/o material; esta etapa de operación puede comprender convenientemente una sub-etapa de mezclar el fluido y/o material con al menos un agente conservante (por ejemplo, un conservante basado en sulfóxido de dimetilo, o DMSO como se llama comúnmente en el campo químico).

Según la presente invención, la sub-etapa de mezcla también tiene lugar mientras que se asegura la separación completa y el sellado hermético del fluido recogido y/o material con respecto al entorno de alrededor.

Convenientemente, la etapa de conservar el fluido muestreado y/o material comprende además una sub-etapa de refrigerar el fluido y/o material bajo una temperatura de conservación predeterminada; esta sub-etapa de refrigeración puede preceder a la sub-etapa de pulverizar y/o mezclar el fluido y/o material con al menos un agente conservante.

Después de tomarse la cantidad deseada de fluido y/o material, y después de hacer posiblemente lo necesario para permitir la conservación del mismo durante un periodo de tiempo indefinido, también es posible transferir el fluido y/o material a medios de almacenamiento adecuados.

Esta etapa de transferir el fluido y/o material a medio de almacenamiento puede optimizarse convenientemente desde el punto de vista logístico asignando una serie de datos al menos referentes al posicionamiento (pero, por tanto, que dependen de requisitos específicos, datos referentes a otros parámetros, tales como datos de muestreo, condiciones medioambientales en el momento del muestreo, operario que ha llevado a cabo el muestreo, etc.) para cada fluido y/o muestra de material; posteriormente, estos datos pueden almacenarse en sistemas de almacenamiento adecuados.

Con relación a la ejecución, el presente método puede aplicarse ventajosamente a la recogida y conservación (además de para un posible y posterior nuevo procesamiento o cultivo) de fluidos orgánicos y/o materiales que contienen citoblastos (tales como el líquido amniótico y/o las vellosidades coriónicas que pueden tomarse, por ejemplo, de una mujer embarazada).

Debe observarse a este respecto que los citoblastos tomados del líquido amniótico pueden usarse como fuente de terapia celular para el tratamiento de patologías en seres humanos: con el fin de garantizar el uso de estas células es de gran importancia garantizar la esterilidad del producto celular con el que el paciente se re-inoculará.

Operativamente, la esterilidad de la muestra de líquido amniótico (o la muestra de vellosidades coriónicas) durante todas las etapas de manipulación tras el verdadero muestreo, o posiblemente también la etapa de conservación/almacenamiento previamente descrita, se garantiza por un instrumento de laboratorio adecuado conocido en el campo técnico con el nombre de “aislador”.

Debe observarse en este momento que el uso del aislador constituye una novedad importante con respecto a las metodologías actualmente aplicadas para la manipulación de citoblastos: en realidad, los operarios que actualmente actúan sobre los citoblastos mueven (y manipulan) el material biológico dentro de salas estériles y, por tanto, aunque tienen todas las protecciones posibles (máscaras, guantes y otros) a su disposición, todavía representan una fuente de contaminación para el fluido orgánico o material en procesamiento, ya que transfieren (al menos mediante la respiración) una carga importante de bacterias o, en cualquier caso de agentes contaminantes (polvos y polvo fino, residuos resultantes de la exfoliación de la piel, etc.), al mismo entorno en el que están los citoblastos.

Por el contrario, el uso del aislador permite la completa separación entre el operario (y sobre todo cualquier fuente de alteración/polución medioambiental conectada a la presencia física del operario) y el fluido y/o material que contiene los citoblastos, o incluso los citoblastos ya separados del fluido/material junto con el que han sido tomados de un paciente dado.

Desde un punto de vista estructural, el aislador empleable en el presente método comprende principalmente una cámara de trabajo que prácticamente es una caja de acero completamente aislada del exterior, provista de un sistema de filtración que tiene filtros del tipo “Hepa” y en los que el acceso para el operario tiene lugar mediante el uso de guantes adecuados que sobresalen de dentro de la caja y conectados de forma sellada con una de las paredes de la caja: convenientemente, esta caja está presurizada a una mayor presión que la cámara de entrada. También está presente una cámara de entrada (también llamada “caja de paso”) para la introducción de la muestra y el material biológico que va a procesarse, cámara que está provista de esclusas que no permiten la comunicación directa entre la cámara de trabajo y el entorno de alrededor.

Asimismo, está presente una cámara de salida que tiene una bolsa estéril de recogida de muestra: esta cámara de salida se pone en comunicación con la cámara de trabajo por esclusas.

Finalmente, está presente un sistema de esterilización para procesar la muestra biológica y esterilizar la superficie externa del recipiente de muestra biológica; el proceso de esterilización tiene lugar por el uso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que se introduce en el aislador antes de cada etapa de trabajo y entre el procesamiento de dos muestras diferentes biológicas con el fin de garantizar la esterilidad absoluta durante la etapa de manipulación; durante esta etapa se analizarán continuamente los parámetros de “recuento de partículas” y/o “recuento microbiológico”.

Por el contrario, con relación a la congelación de los citoblastos, se hace lo siguiente.

A partir de aproximadamente 20 ml de líquido amniótico obtenidos, mediante amniocentesis (o de una cantidad correspondiente de vellosidades coriónicas, obtenidas mediante CVS - muestreo de vellosidades coriónicas), se tomará una parte de alícuota de 2-2,5 ml, a continuación las muestras contenidas en tubos de ensayo de 15 ml con fondo cónico y tapón roscado se centrifugan a 2000 rpm durante 10 minutos.

Después de la centrifugación, el tubo de ensayo se inserta en el aislador y sin alterar el llamado “sedimento celular” se toma el llamado “sobrenadante” y se conserva para preparar la disolución refrigerante para la muestra con 10% de DMSO final.

Esta disolución se enfría usando un aparato de refrigeración adecuado dispuesto dentro del aislador y se usa 1 ml del mismo para suspender de nuevo el sedimento de amniocitos, siendo dicho sedimento entonces insertado en un tubo de ensayo adecuado para la congelación (que en su lugar se ha sacado de la cámara de salida del aislador y luego congelado por un congelador programable).

Al final de la etapa de congelación, la muestra se conserva en recipientes de almacenamiento adecuados que contienen nitrógeno líquido.

Generalmente, la congelación se lleva a cabo en muestras no hemáticas y en muestras que no contienen meconio que haya sido tomado 24-48 horas antes.

La descongelación de los citoblastos se lleva a cabo sacando la muestra del nitrógeno líquido, posicionándola en hielo y llevándola a un termostato de 37 ºC en el periodo de tiempo más corto.

Después de aproximadamente 3 minutos, la muestra descongelada se transfiere al aislador y entonces se transfiere gota a gota a un tubo de ensayo de 15 ml con fondo cónico y tapón roscado (este tubo de ensayo contiene aproximadamente 9 ml de medio de lavado).

Al final de la adición, el tubo de ensayo se saca de la cámara de salida del aislador y posteriormente se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos.

Después de la centrifugación, el tubo de ensayo se inserta en el aislador y, sin alterar el sedimento celular, se toma el sobrenadante; en este momento, el sedimento que contiene células se suspende de nuevo con una sustancia de crecimiento de células adecuada (llamada “medio”) en una cantidad de aproximadamente 2 ml; la suspensión celular se transferirá a un matraz adecuado (llamado en el argot “T25”) para la expansión.

Debe observarse que, según la presente invención, el método de recogida y conservación de fluidos orgánicos y/o materiales que contienen citoblastos (tales como el líquido amniótico y/o vellosidades coriónicas que pueden tomarse de una mujer embarazada) puede, por tanto, comprender una etapa de conservación criogénica y posiblemente una posterior etapa sin almacenar que a su vez comprende al menos una sub-etapa de descongelación.

Más generalmente, también debe observarse que el método de recogida y conservación aplicable a fluidos orgánicos y/o materiales que contienen citoblastos puede comprender ventajosamente una etapa de muestreo (llevada a cabo en un “volumen de recogida” adecuado) que se ejecuta mientras que se mantiene continuamente un

aislamiento microbiológico, atmosférico y físico perfecto entre el volumen de muestreo, la muestra de fluido y/o material recogido y la porción de recogida en la que está confinada el fluido/material.

Con relación al aislador anteriormente mencionado, debe observarse que dentro del alcance de la presente invención la estructura del último se ha concebido adecuadamente para maximizar la eficiencia del método de trabajo.

En primer lugar, se apreciará que el tamaño de la cámara de trabajo del aislador (que puede considerarse a modo de ejemplo como un volumen cúbico que tiene lados de aproximadamente 80 cm) se ha estudiado adecuadamente de manera que se reduzcan los tamaños de las superficies internas y el volumen: este efecto geométrico reduce enormemente el tiempo requerido para la descontaminación de la cámara de trabajo y también reduce el consumo de agentes esterilizantes (tales como peróxido de hidrógeno) requeridos para la descontaminación.

El aislador también ofrece la posibilidad de pre-refrigerar la disolución refrigerante usando un bloque térmico (hecho de acero) alojado dentro de la cámara de trabajo: este posicionamiento del bloque térmico garantiza la máxima esterilidad para la muestra biológica y el área de trabajo, a diferencia de sistemas conocidos que explotan una refrigeración más tradicional por hielo (que no es estéril y no puede esterilizarse) contenido en un recipiente que a su vez no es estéril.

Las características estructurales del aislador ofrecen de este modo la posibilidad de mantener la muestra biológica dentro de la cámara de trabajo a una temperatura controlada (es decir, está presente en la cámara de trabajo medio de regulación de la temperatura, de manera que puedan lograrse condiciones de comodidad adecuadas para el producto y el operario).

Al mismo tiempo, el aislador está provisto de medios de envasado sellados y/o herméticos y/o estériles localizados en la cámara de salida: estos medios de envasado sellados y/o herméticos y/o estériles ofrecen la posibilidad de envasar el producto procedente del aislador de una manera aséptica, por una “bolsa enrollada” estéril adecuada (que a su vez es útil con el fin de llevar la muestra a la congelación criogénica y/o punto de conservación criogénica).

Además, debido a la presencia de la “bolsa enrollada” estéril o medios equivalentes, también puede eliminarse posible residuo de trabajo sin contaminar ninguna parte del aislador (y, por tanto, evitando ciclos de esterilización adicionales que se llevan a cabo).

El presente aislador tiene adicionalmente filtros adecuados (hechos, por ejemplo, de Gore-tex) que son operativamente activos en una línea para la admisión de agentes esterilizantes, y preferentemente una línea para la admisión de peróxido de hidrógeno; de este modo se obtiene otra reducción del tiempo de descontaminación.

Con el fin de alcanzar una mejora ergonómica para la el operario, el aislador también tiene medios de posicionamiento adecuados para una muestra biológica (o, en otras palabras, para el fluido muestreado y/o material), además de para el material requerido para el procesamiento: convenientemente, este medio puede consistir en un estante de acero que tiene el mismo grado de acabado superficial que las paredes del aislador.

El aislador también puede proveerse de medio de movimiento autónomo (por ejemplo, un tren de ruedas pivotantes o similar) que permite el desplazamiento del mismo dentro de la habitación: prácticamente, el medio de movimiento autónomo permite que el aislador se desplace a los puntos deseados, facilitando así la limpieza de la sala y el mantenimiento del propio aislador, por ejemplo (u ofreciendo en cualquier caso la posibilidad de desplazar el aislador a puntos en la sala o laboratorio que son más ventajosos desde un punto de vista de la operación).

Como ya se ha dicho, el aislador también comprende medios de esterilización que actúan al menos sobre la cámara de trabajo y/o la cámara de entrada y/o la cámara de salida: estos medios pueden atomizar convenientemente uno o más agentes esterilizantes de manera que descontaminen cualquier punto del propio aislador.

Para completar los diferentes aspectos de operación del aislador, entonces está presente medio de sensor adecuado que actúa al menos en la cámara de trabajo (pero, si fuera necesario, también en la cámara de entrada y/o la cámara de salida), siendo dicho medio sensor capaz de medir:

- un muestreo microbiológico (normalmente por una entrada de aire dispuesta próxima a la región de trabajo, de manera que tengan una vista más real y más segura de la vecindad de trabajo;
- una velocidad de aire dentro de la cámara de trabajo (estos sensores pueden estar posiblemente acoplados a medios de filtración, que comprenden uno o más filtros del tipo “hepa”, por ejemplo, y/o a medios de ventilación que actúan sobre la cámara de trabajo y/o la cámara de entrada y/o la cámara de salida);
- un número dado de valores de partícula del aire durante el proceso completo;
- una posible cantidad residual de agentes esterilizantes todavía en la cámara de trabajo después de un proceso de esterilización.

Dependiendo de las diferentes ocasiones, el aislador anteriormente descrito también puede usarse separado del método que es el objetivo de la presente invención, es decir, en otros métodos de procesamiento industrial y/o de laboratorio sobre varios tipos de materiales diferentes y/o muestras (biológicas y no biológicas).

La invención permite el logro de ventajas importantes.

En términos de operación, por tanto, la presente invención permite la realización de una recogida más rápida, y método de conservación en comparación con métodos tradicionales en uso; este método también permite que se llevan a cabo generalmente dos operaciones en momentos diferentes (y por tanto requieren tiempo) para integrarse en una única etapa de operación.

Se apreciará que este método es en cualquier caso compatible con las metodologías de operación ya conocidas y que no se requiere un grado diferente de preparación por el personal que lo pone en práctica.

Finalmente, la presente invención permite lograr bajos costes de producción y de venta tanto en términos de fabricación del dispositivo de recogida y conservación como en términos de la económica gestión de los trabajos de muestreo/almacenamiento/análisis que son necesarios en un gran número de campos tecnológicos.

Un método de recogida y conservación de fluidos orgánicos y/o materiales que contienen citoblastos comprende las siguientes etapas: tomar fluido/material que contiene citoblastos de un volumen de muestreo y confinarlo en una muestra y conservar la muestra; la etapa de tomar fluido y/o material se realiza mientras que se mantiene contiguamente un aislamiento microbiológico, atmosférico y físico perfecto entre el volumen de muestreo y el volumen de recogida y el método comprende además una etapa de manipular la muestra bajo condiciones de esterilidad en un aparato aislador que comprende una cámara de trabajo presurizada y aislada con guantes que sobresalen del interior de la caja, una cámara de entrada para la introducción de la muestra y provista de esclusas que no permiten la comunicación directa entre la cámara de trabajo y el entorno, una cámara de salida conectada con la cámara de trabajo puesta en comunicación con la cámara de trabajo por medio de esclusas, medios de esterilización que actúan sobre la cámara de trabajo para procesar la muestra y esterilizar la superficie externa de la propia muestra y un aparato de refrigeración dispuesto dentro del aislador y empleado para una sub-etapa de refrigerar la muestra bajo una temperatura de conservación predeterminada.

REIVINDICACIONES

1.- Un método de recogida y conservación de fluidos orgánicos y/o materiales que contienen citoblastos, comprendiendo dichos fluidos y/o materiales que comprenden un líquido amniótico y/o vellosidades coriónicas, que comprende las siguientes etapas:

- determinar un volumen de muestreo que está cerrado y/o separado del entorno externo;
- tomar una cantidad predeterminada de fluido y/o material que contiene citoblastos de dicho volumen de muestreo y confinar dicha cantidad predeterminada de fluido y/o material que contiene citoblastos en una muestra contenida/definida en un volumen de recogida; y
- conservar dicha muestra;

caracterizado porque:

- dicha etapa de tomar la cantidad predeterminada de fluido y/o material se realiza mientras se mantiene continuamente un aislamiento microbiológico, atmosférico y físico perfecto entre el volumen de muestreo y el volumen de recogida; y porque
- comprende además una etapa de manipular la muestra bajo condiciones de esterilidad en un aparato aislador, comprendiendo dicho aparato aislador:
  - una cámara de trabajo aislada de un entorno externo y provista de un sistema de filtración, siendo un operario capaz de acceder a dicha cámara de trabajo por el uso de guantes adecuados que sobresalen del interior de la caja y conectados de forma sellada con una de las paredes de la cámara de trabajo, estando dicha cámara de trabajo presurizada a una mayor presión que la cámara de entrada;
  - una cámara de entrada para la introducción de la muestra que va a procesarse, estando dicha cámara de entrada conectada a dicha cámara de trabajo y estando provista de esclusas que no permiten la comunicación directa entre la cámara de trabajo y dicho entorno externo;
  - una cámara de salida conectada con la cámara de trabajo y que tiene una bolsa estéril de recogida de muestra, estando puesta dicha cámara de salida en comunicación con la cámara de trabajo por medio de esclusas; y
  - medios de esterilización que actúan al menos sobre la cámara de trabajo y/o la cámara de entrada y/o la cámara de salida y adecuados para procesar la muestra y esterilizar una superficie externa del propio recipiente de la muestra, teniendo lugar un proceso de esterilización antes de cada etapa de trabajo y entre las operaciones para procesar dos muestras diferentes, y
  - un aparato de refrigeración dispuesto dentro del aislador, siendo dicho aparato de refrigeración dispuesto dentro del aislador empleado para una sub-etapa de refrigerar la muestra bajo una temperatura de conservación predeterminada.

2.- Un método según la reivindicación 1, en el que dicha cantidad predeterminada de fluido y/o material que define la muestra comprende entre 1 y 10 cm^3 y siendo preferentemente igual a 3 cm^3.

3.- Un método según la reivindicación 1, en el que dicho aislador también comprende un bloque térmico alojado dentro de la cámara de trabajo y adecuado para la pre-refrigeración de una disolución refrigerante.

4.- Un método según la reivindicación 1, en el que dichos medios de esterilización son adecuados para la atomización de uno o más agentes esterilizantes, teniendo dicho proceso de esterilización preferentemente lugar por el uso de peróxido de hidrógeno introducido en el aislador.

5.- Un método según la reivindicación 1, en el que comprende además una etapa de añadir el fluido y/o material que contiene citoblastos con 10% de DMSO (sulfóxido de dimetilo).

6.- Un método según la reivindicación 1, en el que comprende además una etapa de control continuo de parámetros del recuento de partículas y/o de recuento microbiológico.

7.- Un método según la reivindicación 1, en el que comprende además una etapa de congelación de los citoblastos, comprendiendo dicha etapa las siguientes sub-etapas:

- tomar una cantidad de líquido amniótico y/o vellosidades coriónicas, obtenido mediante CVS (muestreo de vellosidades coriónicas), siendo dicha cantidad igual a 2-2,5 ml;
- admitir dicha cantidad de líquido amniótico y/o vellosidades coriónicas en un recipiente, siendo dicho recipiente un tubo de ensayo de 15 ml con un fondo cónico y un tapón roscado;
- insertar dicho tubo de ensayo en el aislador;
- centrifugar dicha cantidad de un líquido amniótico y/o vellosidades coriónicas a 2000 rpm durante 10 minutos; y
- tomar un sobrenadante de dicho tubo de ensayo.

8.- Un método según la reivindicación 1, en el que también está presente una etapa de conservar la muestra en recipientes de almacenamiento adecuados que contienen nitrógeno líquido.

9.- Un método según la reivindicación 1, en el que comprende además una etapa de descongelar la muestra, comprendiendo dicha etapa las siguientes sub-etapas:

- tomar la muestra de nitrógeno líquido;
- posicionar la muestra en hielo;
- llevar la muestra a un termostato a 37 ºC;
- transferir la muestra al aislador después de dicha etapa de descongelación;
- transferir la muestra gota a gota a un tubo de ensayo que tiene una capacidad de 15 ml, fondo cónico y tapón roscado y que contiene aproximadamente 9 ml de un medio de lavado; y
- centrifugar dicho tubo de ensayo, después de una sub-etapa de extraer el tubo de ensayo del aislador a 1500 rpm durante 10 minutos.

10.- Un método según la reivindicación 9, en el que también están presentes las siguientes etapas:

- posteriormente a la etapa de centrifugar un tubo de ensayo, insertar dicho tubo de ensayo en el aislador;
- tomar un sobrenadante de dicho tubo de ensayo;
- resuspender un sedimento de células contenido en dicho tubo de ensayo con una sustancia de crecimiento adecuada en una cantidad incluida entre 1 ml y 4 ml; y
- transferir dicho sedimento de células y dicha sustancia de crecimiento a un matraz del tipo “T25”.