

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 443**

21 Número de solicitud: 201631640

51 Int. Cl.:

**A01N 1/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**21.12.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.06.2018**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD CARDENAL HERRERA CEU  
(50.0%)  
Avd del Seminario s/n  
46113 Moncada (Valencia) ES;  
BARRAGÁN HERNÁNDEZ, Agustín (25.0%) y  
ESTEVE BERNET, Vicente (25.0%)**

72 Inventor/es:

**BARRAGÁN HERNÁNDEZ, Agustín y  
ESTEVE BERNET, Vicente**

74 Agente/Representante:

**SOLER LERMA, Santiago**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE UTILIZA KLOTZ Y PRODUCTO OBTENIDO CON DICHO PROCEDIMIENTO**

57 Resumen:

Procedimiento para obtener un producto que comprende un soporte gelatinoso de gran transparencia y resistencia que contiene una parte de Klotz, en donde ese soporte es adecuado para conservar en su interior muestras biológicas durante largos periodos de tiempo, y en donde ese soporte permite el acceso visual y físico a las muestras de su interior así como el paso de los ultrasonidos de los ecógrafos sin distorsiones por lo que resulta óptimo para el aprendizaje. El soporte comprende gelatina y Klotz (que a su vez comprende Cloral hidrato, Sodio sulfato anhidro, Potasio Sulfato, Cloruro Sodio, Bicarbonato de sodio, Ácido ascórbico, agua (la mayor parte de la solución) y una pequeña proporción de formol). También es objeto de la patente el producto obtenido.

**ES 2 673 443 A2**

**PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE UTILIZA KLOTZ Y PRODUCTO OBTENIDO CON DICHO PROCEDIMIENTO**

DESCRIPCIÓN

5 Tal y como su nombre indica, la presente invención se refiere a un procedimiento para la conservación de muestras biológicas y el producto que se obtiene y que se utiliza para tal conservación.

La patente por tanto comprende el procedimiento para la conservación de muestras biológicas y el producto obtenido con dicho procedimiento y que se utiliza para conservación de tales muestras.

10 Lo que se persigue es la obtención de un bloque semisólido de gran resistencia y transparencia que permite guardar en su interior muestras biológicas y que estas se conserven durante largos periodos de tiempo todo ello sin perjuicio de permitir el acceso a tales muestras, tanto acceso visual, como físico (a través de punciones u otros medios y sistemas quirúrgicos) o a través de ultrasonidos, siendo de gran valor para su  
15 uso para el aprendizaje.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

Existen diferentes tipos de fijación en que se usan para procesar muestras biológicas. Se agrupan en métodos físicos (como la congelación en Nitrógeno líquido) o métodos  
20 químicos.

Dentro de los métodos químicos el fijador más usado es el formol (formaldehído al 40%). Este compuesto es altamente cancerígeno y su manejo tiene que realizarse con muchas precauciones, por lo que se están buscando sustitutos para eliminar su uso.

25 Ya existen en el mercado algunos sustitutos de formol como el Histofix® que no son tan peligrosos y además su olor no están fuerte.

También existen soluciones que llevan una pequeña proporción de formol como son la solución Bouin y Klotz.

30 La solución Bouin es útil sobre todo para la realización de técnicas inmunohistoquímicas ya que produce una gran fijación nuclear aunque tiene el inconveniente que destruye algunos componentes citoplasmáticos.

Por otro lado el Klotz es una solución compuesta por Cloral hidrato, Sodio sulfato anhidro, Potasio Sulfato, Cloruro Sodio, Bicarbonato de sodio, Ácido ascórbico, agua (la mayor parte de la solución) y una pequeña proporción de formol (5% del total).

Para la fabricación de 5 litros de Klotz el solicitante utiliza las siguientes cantidades de los siguientes elementos.

Para 5 L	
-	Cloral hidrato 49,94g
-	Sodio sulfato anhidro 79,93g
-	Potasio Sulfato 1,26g
-	Cloruro Sodio 1,47g
-	Bicarbonato de sodio 3g
-	Ácido ascórbico 2,64g
-	Agua 4900gr
-	Formol 24,97 ml

5 El Klotz tiene el beneficio que solo tiene una pequeña proporción de formol y permite que las muestras biológicas (órganos, tejidos, etc...) tengan un aspecto macroscópico parecido al que tendrían recién sacados del cadáver y su textura también sería parecida por lo que es muy útil para guardar vísceras para repasos anatómicos y anatomopatológicos.

10 Para fijar las muestras con Klotz, hay que sumergirlas en la solución un mínimo 5 días, y una vez fijadas ya se pueden conservar sumergidas en la solución, siempre que no se sequen, aunque hay que cambiar la solución cada cierto tiempo.

Para evitar tener que cambiar la solución, sea esta la que fuera, y evitar el desecado de las muestras biológicas, una posibilidad era gelificar el fijador de tal modo que tanto la muestra biológica como el fijador quedarán "atrapados" en un bloque semisólido y accesible visualmente, que permitiera la práctica de punciones y otro tipo de pruebas así como útil para la utilización de ecógrafos y sistemas de ultrasonidos.

La utilización de gelatina, por sus características químicas y físicas se consideró idónea.

20 La gelatina en polvo se usa en la industria alimentaria para realizar comidas y postres, pero también se ha utilizado en ecografía, con agua, para realizar fantomas, que son modelos para la práctica de estudio ecográfico. Los distintos fantomas utilizados hasta el momento emplean materiales que pretenden simular la apariencia de órganos (aceitunas, macarrones) o vísceras de matadero (pechugas de pollo, hígados de cordero) que al no estar fijados no pueden mantenerse en el tiempo.

25 La utilización de gelatinas ya viene anticipada en algunos documentos tanto de patentes como de no patente.

5 A modo de ejemplo cabe citar el artículo de JRV Pulvertaft, del Westminster School Hospital of Medicine de Londres "*Museum Techniques, a review*" (1950) que describe en la pag. 16 en la preparación de especímenes transparentes, el uso de composiciones que pueden incluir 5% de gelatina y 0,4% de formalina, siendo que en ese caso los especímenes deben colocarse en el refrigerador para que la gelatina se solidifique.

10 El documento WO0025580A1 hace referencia a un método que utiliza una solución de conservación de material biológico que se encuentra en forma de gel a temperaturas inferiores a 10 grados y presiones superiores a 79 atm, en donde la solución comprende gelatina, preferiblemente en cantidades inferiores al 5%, además de cloruro sódico y azúcares.

El documento GB1253340A describe un medio para la conservación de tejidos y órganos que comprende entre otros compuestos gelatina hidratada, miel y glicerina. Se vuelve líquido a temperaturas superiores a 40°C.

15 Ninguno de los documentos citados resuelve cómo obtener una composición semisólida y altamente transparente que se mantenga estable a temperatura ambiente (20-40°C) y que sea adecuada para la conservación de muestras biológicas.

Algunas de las pruebas de gelificación realizadas -y que abajo se reseñan-, tampoco dieron como resultado un bloque semisólido, altamente transparente y estable a temperatura ambiente.

20 Así por ejemplo, en la gelificación con formol, la gelatina precipitaba al entrar en contacto con éste por lo que resulta imposible formar un bloque compacto.

Por otro lado, en la gelificación con Histofix®, el compuesto gelatinoso resultante era también muy resistente pero de color más amarillento y, además, a temperaturas de 40° centígrados se licua por lo que no ofrece la estabilidad deseada.

25 La invención que se propone, supera los problemas expuestos al obtenerse un bloque semisólido de gran resistencia y transparencia que permite guardar en su interior las muestras biológicas conservadas durante largos periodos de tiempo y permite el acceso a tales muestras tanto visual, como físico (a través de punciones u otros medios y sistemas quirúrgicos) o a través de ultrasonidos, siendo de gran valor para su uso para el aprendizaje.

30

#### **DESCRIPCION DE LA INVENCION**

35 Para facilitar la utilización de las vísceras fijadas y para su uso en otras disciplinas como el diagnóstico por imagen se plantea la utilización de un soporte gelatinoso y con propiedades conservantes.

5 Para ello se ha desarrollado un procedimiento para obtener un producto que comprende un soporte gelatinoso de gran transparencia y resistencia que contiene una parte de Klotz, en donde ese soporte es adecuado para conservar en su interior muestras biológicas durante largos periodos de tiempo, y en donde ese soporte permite el acceso visual y físico a las muestras de su interior así como el paso de los ultrasonidos de los ecógrafos sin distorsiones por lo que resulta óptimo para el aprendizaje.

El soporte comprende gelatina y Klotz (que a su vez comprende Cloral hidrato, Sodio sulfato anhidro, Potasio Sulfato, Cloruro Sodio, Bicarbonato de sodio, Ácido ascórbico, agua (la mayor parte de la solución) y una pequeña proporción de formol).

10 Las pruebas se han hecho con gelatina en polvo por lo que las explicaciones y correspondencias se hacen en base a este tipo de gelatina, no obstante no se descarta que pueda realizarse con otros tipos de gelatina, como la gelatina en láminas o la gelatina instantánea, debiéndose buscar las equivalencias entre una forma de presentación del producto y otra. A modo de ejemplo citamos que 10gr de gelatina en  
15 polvo equivalen a 6 láminas de gelatina en láminas, según la información que obra en el portal [www.gelatine.org](http://www.gelatine.org) de la *Gelatine Manufacturers of Europe* (GME).

El procedimiento para la conservación de las muestras biológicas se inicia con la preparación del compuesto que las contendrá, al que llamaremos "producto" y que también es objeto de la presente patente.

20 Previamente es necesario tanto preparar el Klotz, preferiblemente conforme a la fórmula que se ha expuesto y que al estar ya divulgada no se reivindica, como procesar las muestras biológicas a conservar fijándolas y lavándolas para eliminar los restos de sangre.

25 El lavado de las muestras biológicas y especialmente la eliminación de los restos de sangre, puede hacerse con agua pero preferiblemente debe hacerse con alcohol ya que aclara más el tejido y elimina mejor la sangre.

Una vez hecho lo anterior se sigue el procedimiento objeto de esta patente y que comprende:

1.- Una primera fase de calentamiento de aproximadamente 1/3 del Klotz a utilizar.

30 El calentamiento se realiza en agitación en placa caliente, elevándose la temperatura de forma paulatina y lenta (aproximadamente 30 grados cada minuto) hasta que el Klotz alcanza una temperatura de entre 80° y 99°, preferiblemente de 90° centígrados. Por encima de 100° centígrados los reactivos se evaporarían. El Klotz se mantiene a esa temperatura durante un periodo de tiempo de entre 5 y 10 minutos, preferiblemente 7  
35 minutos.

2.- Una segunda fase, independiente de la primera, en la que se procede a disolver gelatina en los 2/3 restantes del Klotz a utilizar. La cantidad de gelatina que se disuelve es entre un 6% y un 8%, preferiblemente entre un 6,5% y un 7,5% de la cantidad final total de producto que se desea preparar. Si se disminuye la cantidad de gelatina la consistencia no sería la deseada, y si aumenta prácticamente no habría cambio, solo se volvería más turbio el medio y aumentaría el coste.

3.- Una tercera fase en la que, antes de los tres minutos siguientes a la disolución expuesta en la segunda fase, se procede a la mezcla del Klotz caliente de la primera fase con el compuesto de Klotz y gelatina de la segunda fase.

10 Si esta tercera fase se hace pasado los 3 minutos desde la fase 2, la gelatina puede precipitar y no formarse el soporte gelificado de forma correcta.

Con estas tres primeras fases se obtiene el producto que se reivindica en la presente patente.

4.- Una cuarta fase en donde se vierte el producto en un molde con los órganos que se quieran conservar en su interior, existiendo alternativas del procedimiento en función del uso que se le quiera dar a las muestras.

5.- En una quinta fase, el producto, con los órganos en su interior, pasa a ser refrigerado.

20 Como resultado de esta gelificación se obtiene una gelatina prácticamente transparente, más resistente de la normal ya que las proteínas de la gelatina se han fijado. Además esta gelatina permite el paso de los ultrasonidos de los ecógrafos sin prácticamente la aparición de ningún tipo de artefacto.

Algunas de las ventajas de este producto de conservación es que:

- Permite conservar órganos con muy poca cantidad de formol durante largos periodos de tiempo.
- 25 - Permite la conservación y revisión de lesiones menos frecuentes tanto a nivel macroscópico como ecográfico.
- Permite la práctica de punciones ecoguiadas, tanto a nivel docente como a nivel de clínicos profesionales.

30 Como se ha expuesto, en función del tipo de uso que se le pretenda dar a las muestras biológicas puede haber alternativas en la ejecución de la cuarta fase del procedimiento, así por ejemplo:

35 Para crear medios idóneos para ecografía lo mejor es crear en el molde un lecho de producto para evitar que los órganos estén en contacto con el fondo del molde. Una vez hecha la base se colocan los órganos encima, se fijan con agujas o con suturas y se rellena con producto antes de solidificar.

Para la preparación de modelos para cistocentesis se pueden realizar modelos específicos usando vejigas urinarias con sonda uretrales en su interior y una vía aplicada a esta sonda, de forma que la vejiga urinaria se puede rellenar tantas veces como sea necesario.

5 Para ello deben seguirse los siguientes pasos:

- Fijar la vejiga en Klotz
- Meter una sonda urinaria por el cuello de la vejiga, cerrando el cuello alrededor de la sonda con una sutura no reabsorbible.
- Crear en el molde un lecho de producto y fijar la vejiga a esa base con sutura o  
10 agujas.
- Llenar la vejiga con fluido (agua u otro líquido coloreado).
- Rellenar el molde con producto Klotz gelificado líquido antes de solidificar y meter a refrigerar.
- Retirar las agujas.

15

#### DESCRIPCION DE UN MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

20 Tal y como ha quedado expuesto, el procedimiento para la conservación de muestras biológicas tiene una fase previa de preparación de uno de los componentes, el Klotz, que se prepara conforme a las siguientes cantidades y pesos.

Para la fabricación de 5 litros de Klotz el solicitante utiliza las siguientes cantidades de los siguientes elementos.

25

Para 5 L
- Cloral hidrato 49,94g
- Sodio sulfato anhidro 79,93g
- Potasio Sulfato 1,26g
- Cloruro Sodio 1,47g
- Bicarbonato de sodio 3g
- Ácido ascórbico 2,64g
- Agua 4900gr
- Formol 24,97 ml

30

Igualmente, las muestras biológicas, previamente a someterse al proceso de conservación, deben procesarse lo cual comprende:

- 5
1. Fijarlas mediante la utilización de un tipo de fijación, preferiblemente el Klotz si bien pueden usarse otros medios.
  2. Lavarlas para eliminar los restos de sangre, operación que normalmente se lleva a cabo con alcohol de 96° y deben ser eliminados los restos de sangre (se puede retirar con agua pero el alcohol aclara más el tejido y elimina la sangre mejor).

10 El proceso propiamente dicho de conservación de muestras biológicas que se reivindica se inicia con la preparación del producto, y así, para 150ml de producto se sigue el siguiente procedimiento:

1.- Una primera fase de calentamiento de 50ml de Klotz:

15 El calentamiento se realiza en agitación en placa caliente, elevándose la temperatura a razón de 30° grados por minuto hasta que el Klotz alcanza una temperatura de 90° centígrados, temperatura a la que se debe mantener durante 7 minutos.

2.- Una segunda fase, independiente de la anterior, en la que se procede a disolver 10gr de gelatina en polvo estándar en 100ml de Klotz.

20 3.- Menos de tres minutos después de la fase anterior tiene lugar una tercera fase en la que se procede a la mezcla del Klotz a 90° centígrados de la primera fase con el compuesto de Klotz y gelatina de la segunda fase.

Con estas tres primeras fases se obtiene el producto que también se reivindica en la presente patente.

25 Ese producto se caracteriza por que comprende Klotz (cloral hidrato, sodio sulfato anhidro, potasio sulfato, cloruro sodio, bicarbonato de sodio, ácido ascórbico, agua, formol) y gelatina siendo el contenido de gelatina entre un 6% y un 8%, preferiblemente entre un 6,5% y un 7,5% del peso total del producto, y porque además se mantiene estable a temperatura entre 20° y 40°.

30 4.- Para la conservación de las muestras biológicas, el procedimiento comprende una cuarta fase en la que el producto se vierte en un molde y los órganos a conservar se depositan en dicho molde quedando recubiertos con el producto.

En función del uso que se pretenda de las muestras biológicas, los órganos se depositarán de distintos modos que son alternativas del procedimiento de conservación.



4.a. Para conservar los órganos de manera que queden idóneos para ecografía, el procedimiento comprende, dentro de la fase 4 las siguientes subfases:

- Creación en el molde de un lecho de producto para evitar que los órganos estén en contacto con el fondo del recipiente.
- 5 – Una vez hecha la base se colocan los órganos sobre la misma y se fijan con agujas o con suturas.
- Se procede a rellenar el molde con el producto hasta al menos cubrir la muestra para, posteriormente, retirar las agujas.

10 4.b. Para la conservación de órganos que sirvan de modelo para cistocentesis, de forma que la vejiga pueda rellenarse tantas veces como sea necesario, el procedimiento comprende, dentro de su fase 4 las siguientes subfases:

- Meter una sonda urinaria por el cuello de la vejiga, cerrando el cuello alrededor de la sonda con una sutura no reabsorbible.
- Crear un lecho de producto en la base del molde y fijar la vejiga al lecho con sutura o agujas.
- 15 - Llenar la vejiga con fluido (agua u otro líquido coloreado).
- Rellenar el molde con producto hasta al menos cubrir la muestra.
- Posteriormente se retiraran las agujas.

20 5.- Por último, una quinta fase del procedimiento de conservación de muestras biológicas, comprende el refrigerado (entre 7 y 14 grados) del producto con los órganos en su interior.

25 Como resultado de esta gelificación se obtiene una gelatina prácticamente transparente, más resistente de la normal ya que las proteínas de la gelatina se han fijado. Además esta gelatina permite el paso de los ultrasonidos de los ecógrafos sin prácticamente la aparición de ningún tipo de artefacto.

30 Los órganos que se meten dentro moldes pueden ser prácticamente todos (probado con riñones, intestinos, hígado vejiga urinaria, encéfalos, pulmones y corazones). Estos órganos deben ser fijados previamente, preferiblemente en Klotz como se describió anteriormente y además se deben lavar preferiblemente con alcohol 96° para eliminar restos de sangre.

## REIVINDICACIONES

1.- PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE UTILIZA KLOTZ en donde las muestras se encuentran previamente fijadas y lavadas caracterizado por que comprende:

- 5 Una primera fase de calentado de 1/3 del Klotz a utilizar y en donde ese Klotz es calentado, durante un tiempo de entre 2 y 4 minutos, , hasta alcanzar una temperatura de entre 80° y 99°, manteniéndose a esa temperatura durante un periodo de tiempo de entre 5 y nueve minutos.

- 10 Una segunda fase, independiente de la primera, en la que se procede a disolver gelatina en los 2/3 restantes del Klotz a utilizar. La cantidad de gelatina que se disuelve es entre un 6% y un 8%, de la cantidad final total de producto que se desea preparar.

Una tercera fase en la que, antes de los tres minutos siguientes a la disolución expuesta en la segunda fase, se procede a la mezcla del Klotz caliente de la primera fase con el compuesto de Klotz y gelatina de la segunda fase.

- 15 2.- PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE UTILIZA KLOTZ conforme reivindicación 1 caracterizado por que comprende además:

Una cuarta fase en al que se introducen en un molde el producto obtenido con el procedimiento expuesto en la reivindicación 1 y las muestras biológicas a conservar.

- 20 Una quinta fase en la que el resultado de la cuarta fase para a ser refrigerado a una temperatura de entre 7° y 14°.

3.- PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE UTILIZA KLOTZ conforme reivindicación 2 caracterizado por que la introducción del producto y las muestras a conservar en el molde se lleva a cabo conforme a las siguientes subfases:

- 25 – Creación en el molde de un lecho de producto.  
– Colocación de las muestras a conservar sobre el lecho sujetándolas al mismo.  
– Rellenado del molde con el producto al menos hasta cubrir las muestras a conservar.  
– Retirada de los medios de fijación de las muestras al lecho.

- 30 4.- PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE UTILIZA KLOTZ conforme reivindicación 2 caracterizado por que las muestras comprenden al menos una vejiga y por que la introducción del producto y las muestras a conservar en el molde se lleva a cabo conforme a las siguientes subfases:

- 35 - Introducción de una sonda por el cuello de la vejiga, cerrando el cuello alrededor de la sonda con una sutura no reabsorbible.  
- Creación en el molde de un lecho de producto.  
- Sujeción de la vejiga al lecho.

- Llenado de la vejiga con fluido.
  - Rellenado del molde con el producto al menos hasta cubrir las muestras a conservar.
  - Retirada de los medios de sujeción de las muestras al lecho.
- 5 5.- PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE UTILIZA KLOTZ conforme reivindicación 1 caracterizado por que el klotz se calienta en agitación y gradualmente.
- 10 6.- PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE UTILIZA KLOTZ conforme reivindicación 1 caracterizado por que la etapa de calentado del klotz hasta alcanzar su temperatura adecuada es de 3 minutos.
- 15 7.- PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE UTILIZA KLOTZ conforme reivindicación 1 caracterizado por que la temperatura adecuada que debe alcanzar el klotz es de 90°.
- 15 8.- PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE UTILIZA KLOTZ conforme reivindicación 1 caracterizado por que el tiempo que debe permanecer el klotz a la temperatura adecuada es de 7 minutos.
- 20 9.- PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE UTILIZA KLOTZ conforme reivindicación 1 caracterizado por que la cantidad de gelatina que se disuelve es entre un 6,5% y un 7,5% de la cantidad final total de producto que se desea preparar.
- 25 10.- PRODUCTO OBTENIDO mediante el procedimiento descrito en la reivindicación 1 caracterizado por que comprende Klotz (cloral hidrato, sodio sulfato anhidro, potasio sulfato, cloruro sodio, bicarbonato de sodio, ácido ascórbico, agua, formol) y gelatina siendo la cantidad de gelatina entre un 6% y un 8%.
- 25 11.- PRODUCTO OBTENIDO conforme reivindicación anterior caracterizado por que 5 litros de klotz comprenden
- Cloral hidrato 49,94g
  - Sodio sulfato anhidro 79,93g
  - Potasio Sulfato 1,26g
  - 30 - Cloruro Sodio 1,47g
  - Bicarbonato de sodio 3g
  - Ácido ascórbico 2,64g
  - Agua 4900gr
- Formol 24,97 ml
- 35 12.- PRODUCTO OBTENIDO conforme reivindicación 10 caracterizado por que la cantidad de gelatina es entre un 6,5% y un 7,5% del peso total del producto obtenido.
- 13.- PRODUCTO OBTENIDO mediante el procedimiento descrito en la reivindicación 1 caracterizado por que es semisólido a temperatura entre 20° y 40°.