

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 594**

51 Int. Cl.:

B04B 5/00 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2008 PCT/US2008/054649**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2017 WO09085330**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2008 E 08868115 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2129767**

54 Título: **Método y aparato mejorado para la separación y recogida de células desde una muestra de sangre entera**

30 Prioridad:

23.03.2007 US 690340

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

11.03.2019

73 Titular/es:

**BECKMAN COULTER, INC. (100.0%)
250 S. Kraemer Boulevard
Brea, CA 92821, US**

72 Inventor/es:

**APARICIO, CARLOS y
RABELLINO, ENRIQUE**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 703 594 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 aparato mejorado para la separación y recogida de células desde una muestra de sangre entera

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a mejoras en los métodos y los aparatos para extraer selectivamente células de interés de una muestra de sangre entera. Más en particular, se refiere a un método fácilmente automatizable para separar y recoger glóbulos sobre la base de sus correspondientes densidades.

10

Técnica anterior

Una caracterización detallada de diferentes tipos de células, p.ej., linfocitos, monocitos, eosinófilos, etc., que se encuentran en una muestra de sangre entera puede proporcionar una huella fenotípica y funcional del sistema inmunitario de un paciente a diferentes y diversos niveles de activación. Esta información es vital para diversas estrategias de investigación, p.ej., dentro de la industria farmacéutica, para determinar la eficacia y la toxicidad de nuevos fármacos. Para este fin, las empresas farmacéuticas llevan a cabo ensayos clínicos a gran escala que incluyen múltiples recogidas de muestras y sitios de análisis en todo el mundo, donde se separan las células de interés de otras células y se recogen para investigación.

15

20

Hasta la fecha, el proceso para preparar muestras de sangre para una separación de células por densidad flotante ha venido siendo tedioso y laborioso, al igual que lo ha sido el propio proceso para la recogida de células. El gran número de muestras y las diferencias en la práctica de cada emplazamiento de análisis supone por lo general un complicado reto para interpretar los datos y generar conclusiones técnicas.

25

Siendo así, ha sido una práctica común preparar manualmente muestras de sangre para la separación de células mononucleares estratificando cuidadosamente en primer lugar la muestra de sangre encima de la superficie de un medio de gradiente de densidad adecuado dispuesto dentro de un tubo de centrífuga. Durante este proceso de estratificado, si se creara cualquier turbulencia en la interfaz entre la muestra y el gradiente de densidad, se "perdería" un número indeterminado de glóbulos dentro del material de gradiente de densidad. Después de estratificar la muestra de sangre encima del material de gradiente de densidad, el tubo y todo su contenido se somete a una centrifugación a una velocidad relativamente baja (p.ej., de 200 a 400 fuerza g) durante un breve período de tiempo (p.ej., aproximadamente 30 minutos). Esta etapa de centrifugación causa un movimiento diferencial de diversos tipos de glóbulos dentro del tubo hasta que todas las células alcanzan un equilibrio flotante; en este momento, los granulocitos y eritrocitos relativamente densos se habrán desplazado al fondo del tubo y formarán un aglomerado sólido, las plaquetas y el plasma se habrán desplazado hacia la porción superior del tubo, por encima del material de gradiente de densidad y las células mononucleares diana habrán formado una capa relativamente delgada diferenciada, p.ej., de aproximadamente 1,5 mm de espesor, situada en la interfaz entre el plasma y el gradiente de densidad. A continuación, se consigue la recogida de las células mononucleares descendiendo manualmente una pipeta hacia la capa de células mononucleares y extrayendo un volumen de células deseado de esta capa. Si bien, en principio, este método es relativamente sencillo de realizar, conseguir una uniformidad de resultados, de una persona a la siguiente, así como de un laboratorio al siguiente, resulta difícil, en el mejor de los casos.

30

35

40

45

Tal como se ha indicado, se reconoce que el proceso mencionado para estratificar una muestra de sangre encima de un material de gradiente de densidad es un proceso relativamente tedioso y que requiere tiempo. Una técnica que trata de abordar estas cuestiones es el uso de un dispensador de sujeción manual o de funcionamiento manual que se adapta para inyectar el material de gradiente de densidad por debajo de la muestra de sangre en un tubo, en lugar de añadir cuidadosamente la muestra de sangre por encima de la superficie de la capa de gradiente de densidad que ya está en el tubo. Dicho dispensador comprende una sonda dispensadora estrecha que está conectada convenientemente con la jeringuilla sujeta manualmente que contiene el material de gradiente de densidad. Al utilizarla, se inserta la sonda dispensadora dentro del tubo que contiene la muestra de sangre y se hace avanzar a través de la muestra de sangre hasta una posición próxima al fondo del tubo. A continuación, se activa la jeringuilla para inyectar lentamente el material de gradiente de densidad en el fondo del tubo, con lo cual se hace que se eleve la muestra de sangre por encima. Esto se conoce como técnica de "sub-estratificación" y en Technical Report de A. Islam, publicado en Journal of clinical Pathology, 1995, Vol. 48, pp. 686-688 se notifica una construcción dispensadora adecuada para llevarla a cabo.

50

55

60

Si bien utilizar un dispensador de gradiente de densidad del tipo que se ha explicado proporciona teóricamente ciertas ventajas con respecto a la técnica de sobre-estratificación más convencional para disponer una muestra de sangre encima de un material de gradiente de densidad, el uso de dicho dispositivo no produce necesariamente unos resultados uniformes. A no ser que se inyecte de forma continua el medio de gradiente de densidad en un emplazamiento óptimo en el fondo del tubo y que se inyecte a un caudal relativamente constante, puede tener lugar una perturbación turbulenta quedándose atrapado un número impredecible de células de la muestra en el material de gradiente de densidad y de manera que las células no queden disponibles en su mayoría para la posterior recogida. Claramente, existe la necesidad de eliminar esta implicación manual en el proceso de separación de

65

células para reducir la variabilidad en el número de células que se recogen en última instancia.

En el documento US 2003/0119077 se divulga el aislamiento de células dentro de una muestra de glóbulos por separación de gradiente de densidad.

5

Sumario de la invención

En vista de lo que se acaba de explicar, un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo método mejorado para la separación y recogida de células mononucleares y/u otras células de interés de una muestra de sangre entera, un método que puede automatizarse fácilmente utilizando un dispositivo de aspiración de líquidos y dispensador que ya existe.

10

Otro objeto de la invención es proporcionar un aparato mejorado para separar y recoger las células deseadas en una muestra de células.

15

De acuerdo con una realización preferente de la invención, un nuevo método mejorado para separar y recoger células de interés de una muestra de sangre entera comprende las etapas de (a) depositar un volumen predeterminado de una muestra de sangre entera diluida en un tubo; (b) dispensar un volumen predeterminado de una solución de gradiente de densidad a una velocidad determinada en el fondo de dicho tubo, proporcionando así una capa de una solución de gradiente de densidad sub-estratificada bajo la muestra de sangre diluida, teniendo dicha solución de gradiente de densidad una densidad sustancialmente igual o ligeramente superior a la densidad de las células de interés; (c) centrifugar el contenido del tubo para producir una capa de célula que comprende predominantemente las células de interés, estando situada dicha capa de células dentro del tubo en un emplazamiento que está encima de la solución de gradiente de densidad dentro del tubo, (d) hacer avanzar el extremo distal de una sonda de aspiración/dispensadora a un emplazamiento predeterminado dentro del tubo en la que un puerto de aspiración/dispensa, situado en el extremo distal de la sonda, está por debajo de la capa de células no más de una distancia predeterminada y (e) aspirar un volumen predeterminado de un líquido desde el tubo al mismo tiempo que la sonda permanece en dicha posición predeterminada, siendo dicho volumen predeterminado suficiente para (i) descender el nivel de la capa de células a un nivel en el que queda sumergido el puerto d la sonda en la capa de células y (ii) permitir que el puerto de sonda permanezca dentro de la capa de células hasta que dicho volumen de líquido predeterminado ha sido aspirado, lo cual incluye normalmente una porción de la solución de gradiente de densidad, así como las células de interés. Preferentemente, se proporciona un movimiento lateral relativo entre la sonda y el tubo para aspirar las células de interés desde diferentes porciones de la capa de células.

20

25

30

35

La invención, así como sus ventajas, se podrán apreciar mejor con la descripción detallada que sigue de las realizaciones preferentes, haciendo referencia a los dibujos adjuntos donde los caracteres de referencia indican las mismas partes.

40

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un producto que está construido y programado para llevar a cabo de forma automática al menos las etapas (b), (d) y (e) del proceso que se ha indicado.

Breve descripción de los dibujos

45

La Figura 1 es una ilustración esquemática de un método de la técnica anterior para recoger células mononucleares de una muestra de sangre entera;

Las Figuras 2 y 3 son ilustraciones esquemáticas de métodos preferentes de la invención;

50

Las Figuras 4A y 4B son vistas en perspectiva de aparatos preferentes para llevar a cabo los métodos de la invención;

La Figura 5 es un gráfico en el que se compara la recogida de células y la viabilidad de las células separadas y recogidas a través del método manual de la técnica anterior y el método automático de la invención;

Las Figuras 6A y 6B son histogramas en los que se comparan las caracterizaciones fenotípicas de células recogidas manualmente frente a las células recogidas según el método de la invención.

55

La Figura 7 es un gráfico de barras en el que se comparan los porcentajes de células recogidas según el método automático de la invención y según la técnica anterior que tuvieron una respuesta positiva a siete anticuerpos diferentes; y

Las Figuras 8A y 8B son gráficos de dispersión de análisis de citoquinas intracelulares de PBMC recogidas según el método automático de la invención y el método manual de la técnica anterior.

60

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

Haciendo referencia ahora a los dibujos, la Figura 1 ilustra el método manual "de referencia" convencional para separar y recoger células de interés, p.ej., células mononucleares, CM de una muestra de sangre entera periférica MSE. La separación de células se basa en el uso de una técnica de gradiente de densidad/centrifugación convencional en la que se estratifica cuidadosamente sangre diluida encima de una solución de un material de

65

gradiente de densidad adecuado dispuesto en un tubo de ensayo y después se someten a centrifugación el tubo y el contenido del tubo. Durante dicha centrifugación, el desplazamiento de células diferencial, sobre la base de las correspondientes densidades flotantes de cada célula individual tiene como resultado la formación de varias capas fácilmente visibles de diferentes tipos de células en el tubo. La recogida de los tipos de células de interés se puede llevar a cabo de forma manual por pipeteado de la capa de células de interés.

Brevemente, el método de la Figura 1 comienza normalmente dispensando un pequeño volumen (p.ej. de 4 a 5 ml) de una solución de gradiente de densidad estéril SGD en un tubo de centrifuga adecuado TC, que se presenta como etapa (a). Cuando se ha de recoger células mononucleares (CM) de la muestra de sangre entera, la solución de gradiente de densidad deberá tener una densidad sustancialmente igual o ligeramente superior al promedio de densidad de linfocitos, es decir 1,077 g/ml. Una solución de gradiente de densidad adecuada se distribuye con el nombre comercial Ficoll Paque PLUS, un producto de General Electric Healthcare, Uppsala, Suecia. Este producto es una solución acuosa de Ficoll PM44 y diatrizoato sódico y tiene una densidad (peso específico) de 1,077 g/ml precisamente. La siguiente etapa, que se muestra como etapa (b) es la de estratificar manualmente un volumen en cierto modo mayor (p.ej., de 7 a 10 ml) de una muestra de sangre entera diluida MSE encima de la solución de gradiente de densidad. Esta etapa requiere una considerable destreza y paciencia por parte del colaborador del laboratorio ya que cualquier turbulencia significativa creada en la interfaz SGD/MSE tendrá como resultado normalmente una pérdida permanente de las células de la muestra en la solución de gradiente de densidad. Tal como se ha señalado, se ha demostrado que la estratificación de una muestra de sangre diluida encima de una solución de gradiente de densidad también se consigue en el orden inverso, es decir introduciendo primero la muestra de sangre diluida en el tubo y utilizando después una jeringuilla controlada manualmente para inyectar la solución de gradiente de densidad por debajo de la muestra de sangre, con lo cual se hace que la muestra de sangre se eleve por encima de la solución inyectada. Si bien este enfoque de "sub-estratificación" manual puede proporcionar ciertas ventajas con respecto al enfoque de "sobre-estratificación" normal por lo que respecta a la velocidad y comodidad, hay que ser muy cuidadoso todavía para asegurar que (i) la punta del dispensador entra y sale de la muestra de sangre entera sin introducir ninguna turbulencia, (ii) la punta dispensadora de la jeringuilla se mantiene siempre en el fondo del tubo durante el proceso de dispensación y (iii) la velocidad de dispensación, que se controla manualmente, es lenta y continua para no formar burbujas ni que se produzca una turbulencia significativa al introducir la solución de gradiente de densidad en el fondo del tubo. Dadas estas consideraciones, el método de "sobre-estratificación" es normalmente el método seleccionado para crear una capa de muestra encima del material de gradiente de densidad.

Una vez que se estratifica manualmente una muestra de sangre entera diluida encima de una solución de gradiente de densidad adecuada, la siguiente etapa, indicada como (c) es colocar el tubo en una centrífuga en la que se centrifuga el contenido a una velocidad relativamente lenta (p.ej. para conseguir una fuerza g de 200-400) durante un breve periodo de tiempo (p.ej. de 15 a 30 minutos). Durante esta etapa de centrifugación, los glóbulos rojos relativamente densos, así como los granulocitos de la población de glóbulos blancos, se sedimentan a través de la solución de gradiente de densidad y forman un aglomerado P en el fondo del tubo. Al mismo tiempo, las células mononucleares CM, compuestas de linfocitos (que tienen una densidad de 1,077 g/ml) y los monocitos (que tienen una densidad de 1,065 g/ml), forman una capa de células mononucleares, CCM, fina (p.ej., 1,5 mm de espesor), que es traslúcida y fácilmente visible encima de la capa de gradiente de densidad. El resto del contenido del tubo (encima de la capa de células nucleares) comprende una capa de plasma sanguíneo que contiene plaquetas que tienen una densidad significativamente más baja que las células mononucleares.

La recogida de las células mononucleares ahora separadas de la capa de células CCM se suele conseguir utilizando una pipeta de Pasteur manual P'. Durante la recogida de las células, que se muestra en la etapa (d), se hace avanzar la punta de la pipeta manualmente a través de la capa de plasma y se inserta cuidadosamente en la capa de CM. Durante el proceso de pipeteado, se debe tener mucho cuidado de que la punta de la pipeta permanezca sumergida en la capa de CM; de lo contrario, se aspirará un sustancial volumen de la solución de gradiente de densidad sub-estratificada o el plasma situado encima. Después de cada una de las múltiples etapas de pipeteado para asegurar que la mayor parte de las células en la capa de CM ha sido recogida, se recogen las células mononucleares aspiradas (etapa (e)) en un recipiente C, p.ej., otro tubo de centrifugación en el que se preparan las células para posterior análisis. Este proceso incluye habitualmente las etapas de mezclado de las células con solución de tampón fosfato (PBS), centrifugación de la solución tamponada para producir un aglomerado de células mononucleares, decantación del sobrenadante, descomposición del aglomerado, resuspensión de las células mononucleares en un tampón y finalmente análisis de la solución de células mononucleares.

Tal como se podrá deducir de la descripción anterior, el método "de referencia" de recogida de células de interés a partir de una muestra de sangre entera está lleno de posibilidades de que se produzcan errores. Incluso el más ligero movimiento involuntario de la persona que estratifica inicialmente la muestra de sangre antes de la centrifugación, ya se trate del enfoque de "sub-estratificación" o "sobre-estratificación", o de la persona que manipula la pipeta para recoger las células puede producir resultados que deban ser descartados. Es necesario un enfoque mejor, más sólido, seguro y rápido.

Haciendo referencia ahora a la Figura 2, el método para separar y recoger las células de acuerdo con la presente invención es aquel que permite automatizar las etapas más problemáticas del método manual de la técnica anterior

(que se ha descrito). Si bien este método se puede llevar a cabo manualmente, es altamente preferente que se lleve a cabo todo, salvo la etapa de centrifugación, que se lleva a cabo mediante otro instrumento automático fuera de línea, con un único instrumento automático, por ejemplo, una versión modificada del preparador de muestras Coulter PrepPlus™ fabricado por Beckman Coulter, inc., Fullerton, CA. Las características normales del instrumento PrepPlus que lo hacen especialmente útil para llevar a cabo una realización preferente de la invención incluyen: (1) una sonda de aspiración/dispersión punzante, una pipeta de acero inoxidable revestida con Teflon® que es capaz de alcanzar el fondo de un tubo de centrifugación de 15 ml normal; (2) un transmisor de sonda x/Y/Z para hacer avanzar con precisión la sonda (a través de tres motores de pasos de precisión) en tres planos perpendiculares entre sí para situar con precisión el extremo distal de la sonda dentro de uno de una pluralidad de diferentes tubos y recipientes situados en diferentes emplazamientos encima de la superficie de trabajo del instrumento; (3) una bomba de jeringuilla controlada por un motor de pasos para aspirar volúmenes de precisión de líquido desde un recipiente a través de la sonda, y para dispensar dichos volúmenes a través de la misma sonda a velocidades controladas con precisión; y (4) un controlador programable a través del cual se puede controlar con precisión el movimiento de la sonda y el aspirado líquido y las velocidades y volúmenes de dispensación según sea necesario al llevar a cabo el método de la invención. Además de la necesidad de programar adecuadamente el movimiento de la sonda de aspiración/dispensación y su velocidad de dispensación de líquido para llevar a cabo las etapas del método que se describen más adelante, el instrumento PrepPlus se modifica preferentemente (i) para incluir una bomba de jeringuilla de 10 ml, en lugar de una bomba de jeringuilla de 1,0 ml provista con el instrumento y (ii) para preparar varias muestras para centrifugación sin necesidad de manejar físicamente cada tubo individual, para reemplazar el carrusel de tubos que se utilizan actualmente en dicho instrumento para soportar varios tubos durante la preparación de la muestra, con "adaptador" de tubo" de centrifugación normal del tipo que se emplea normalmente para soportar varios tubos durante la centrifugación dentro del instrumento de centrifuga. En las Figuras 4A y 4B se muestra esquemáticamente un instrumento para llevar a cabo el método de la invención.

Haciendo referencia brevemente a la FIG. 4A, se muestra el aparato de la invención como uno que comprende una versión modificada del instrumento PrepPlus que se ha indicado. Dicho instrumento comprende una carcasa 10 que tiene una plataforma de trabajo 11 que soporta una rejilla de tubos 12 adaptada para sostener varios recipientes de muestra o de muestras selladas 14 en una posición vertical. La plataforma de trabajo también soporta un carrusel de tubos para soportar varios tubos 15 en los que puede tener lugar la preparación de la muestra, y diversos recipientes de reactivos que guardan los diversos reactivos con los que se han de mezclar las muestras. Se monta para poderse desplazar una sonda de aspiración/dispensación SAD (se muestra mejor en la Figura 4B) dentro de la carcasa en el espacio de arriba de los recipientes de muestra. Tal como se muestra en la Figura 4B, se monta la sonda para que se mueva a lo largo de los tres ejes perpendiculares entre sí, X, Y y Z, así, el extremo distal de la sonda, a través del cual tiene lugar la aspiración de líquido y dispensación puede tener acceso al contenido de cualquier tubo o recipiente en la carcasa. El extremo proximal de la sonda está conectado de forma fluida con una bomba bidireccional, es decir, una bomba de jeringuilla, que tiene un actuador móvil que controla el modo de la bomba, es decir, aspiración o dispensación, y la velocidad de aspiración y dispensación del líquido. El movimiento del actuador de bomba se controla mediante un motor de pasos de precisión que funciona bajo el control de un controlador programable que comprende un microprocesador. El movimiento de la bomba, junto con el eje Z, para permitir que la punta de la sonda entre y salga de diferentes recipientes, se controla mediante un motor de pasos Z 16 que sirve para hacer avanzar selectivamente una rejilla lineal orientada verticalmente 18 en direcciones opuestas en un soporte 20. El mecanismo de movimiento Z se monta para que se pueda deslizar sobre un marco lineal 22 que se extiende a lo largo del eje X y se controla su movimiento a lo largo del eje X, a través de un sistema de transmisión por correa, mediante el motor de pasos X 24. El movimiento a lo largo del conjunto de sonda a lo largo del eje Y se controla mediante un motor de pasos Y 26 que hace avanzar el conjunto de sonda-soporte a lo largo del marco 30 que se extiende a lo largo del eje de las Y. El funcionamiento de todos los motores de pasos se controla a través de un controlador de sistema programable. Se proporciona un limpiador de sonda 15 en la plataforma de trabajo para lavar la sonda, por dentro y por fuera, después de cada ciclo de uso.

Tal como se ha señalado, el instrumento PrepPlus ha sido modificado para llevar a cabo el método de la invención. En particular, se ha sustituido la bomba de jeringuilla de 1,0 ml (máxima capacidad) que se utiliza normalmente en este instrumento para aspirar muestras y volúmenes de reactivo relativamente diminutos, del orden de microlitros, por una bomba de 10 ml. Además, se debe reprogramar adecuadamente el microprocesador que controla el movimiento de la sonda y sus velocidades de aspiración/dispensación para conseguir, p.ej., el movimiento lateral deseado para recoger las células de todas las porciones de la capa de células separada, y para dispensar y aspirar líquido, a las velocidades deseadas y desde los niveles apropiados dentro del tubo, etc. para llevar a cabo la sub-estratificación del material de gradiente de densidad y la recogida de las células de interés desde la capa de células separada que resulta de la centrifugación. Preferentemente, el carrusel de tubos C se sustituye por el adaptador de tubos que se ha mencionado, que se adapta para sujetar varios tubos de centrifugación dentro de un instrumento de centrifugación convencional durante el proceso de centrifugación. Dicho adaptador de tubo está soportado de manera que se puede desprender sobre una plataforma de trabajo 12 y después de haber preparado cada uno de los tubos en el adaptador para centrifugación, se separa el adaptador de tubo del instrumento y se transporta manualmente a la centrifuga en la que se centrifugan simultáneamente todos los tubos en el adaptador. Tal como se ha señalad, esta modificación evita la necesidad de tener que transferir manualmente cada uno de los tubos desde el carrusel a la cubeta de centrifugación antes de la centrifugación.

Haciendo referencia de nuevo a la Figura 2, se muestra y se describe el método preferente de la invención, como en el caso de la Figura 1, que se utiliza para separar y recoger células mononucleares CM desde una muestra de sangre entera. Se ilustran las etapas de aspiración y dispensación del líquido del método, que se llevan a cabo con la sonda de aspiración y dispensación SAD y la bomba de jeringuilla programable del instrumento Prep/Plus. El método de la invención comienza por la dispensación de un volumen predeterminado (p.ej. 4,0 ml) de una muestra de sangre entera tratada con EDTA o heparinizada a un tubo de centrifugación TC (p.ej., un tubo de 15 ml normalizado). Esta etapa se puede llevar a cabo programando la sonda para que entre en un tubo seleccionado entre una pluralidad de viales V sellados soportados por una rejilla R, aspirando el volumen de la muestra deseado, moviéndose después a un tubo seleccionado en la cubeta de centrifugación y dispensando el volumen que se acaba de aspirar de la muestra. Una vez dispensado un volumen de la muestra de sangre entera en un tubo TC en particular, se añade un volumen igual de PBS (4,0 ml) para proporcionar una muestra de sangre entera diluida 1:1 dentro del tubo TC. La adición de PBS a la muestra de sangre se efectúa programando el instrumento PrepPlus para aspirar un volumen deseado de PBS desde un recipiente de suministro a bordo y para dispensar dicho volumen en el tubo que contiene la muestra a través de una sonda SAD. Se dispensa PBS a una velocidad controlada adaptada para conseguir un mezclado a fondo de los líquidos.

La siguiente etapa, que se muestra como etapa (c) es sub-estratificar cuidadosamente la muestra de sangre entera en el tubo TC con un volumen predeterminado (p.ej., 4,0 ml) de material de gradiente de densidad, en este caso, la solución Ficoll Paque Plus antes indicada. Esta etapa se puede llevar a cabo programando el instrumento PrepPlus para aspirar dicho volumen predeterminado del material de gradiente de densidad desde un recipiente de suministro a bordo y para dispensar dicho volumen en íntima proximidad con el fondo del tubo a una velocidad lenta y controlada para no perturbar la muestra de sangre sobre-estratificada. Tal como se ha indicado, el movimiento de la sonda se controla con precisión en el instrumento PrepPlus mediante motores de pasos de precisión y la velocidad de dispensación de líquido y los perfiles de aceleración se controlan con precisión mediante un motor de pasos que funciona bajo el control de un microprocesador a bordo para controlar el movimiento actuador de la bomba de la jeringuilla bidireccional a través del cual se suministra la solución del gradiente de densidad. A medida que se añade la solución del gradiente de densidad en el fondo del tubo, la muestra de sangre entera diluida se eleva por encima tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, se extrae la sonda desde el tubo a una velocidad constante, de nuevo, para evitar que se cree cualquier turbulencia dentro del tubo.

Después de crear una capa de sangre entera encima de la solución de gradiente de densidad en un tubo de centrifugación, se separa manualmente el tubo del aparato de preparación de muestras y se centrifuga, tal como se ha descrito, para separar físicamente las células de diferentes tipos dentro del tubo, apareciendo la capa de células de interés (es decir, células mononucleares) en un emplazamiento inmediatamente encima del material de gradiente de densidad. Tal como se ha indicado, este tubo de centrifugación puede ser uno entre los muchos tubos soportados por el adaptador de tubo, y una vez que cada tubo ha recibido una muestra de sangre con un sub-estrato de material de gradiente de densidad tal como se ha descrito, se puede separar manualmente el adaptador del instrumento de aspiración/dispensación y colocarlo en una centrífuga en la que se procesan todos los tubos para conseguir la separación de células.

A continuación, de acuerdo con un importante aspecto de la invención, se recogen las células de interés (es decir las células mononucleares) desde la capa de células (CCM) haciendo avanzar el extremo distal de una sonda de aspiración/dispensación (p.ej. la sonda SAD del Instrumento PrepPlus) hasta un emplazamiento predeterminado dentro del tubo en el que un puerto de aspiración/dispensación P', situado en la punta extrema del extremo distal de la sonda, está debajo de la capa de células en una distancia no superior a la predeterminada d, tal como se muestra en la Figura 2 como etapa (e). A continuación, se aspira un volumen predeterminado de líquido del tubo al mismo tiempo que la sonda permanece en dicho emplazamiento predeterminado. Durante esta aspiración, el nivel de la capa de células mononucleares goteará de forma continua en el tubo hasta que la capa de células sumerja completamente el puerto de aspiración de la sonda, tras lo cual la capa de células disminuirá gradualmente de espesor, tal como se muestra en la etapa (e'), a medida que las células mononucleares sean aspiradas de ella. El volumen predeterminado para su aspiración es el suficiente para (i) hacer descender el nivel de la capa de células CM a un nivel en el que el puerto de sonda queda sumergido en la capa de células y (ii) permitir la recogida de al menos un 90 % de las células mononucleares en la capa de células. El volumen ideal aspirado depende del diámetro del tubo y del volumen inicial de la muestra de sangre. Para un tubo de centrifugación de 15 ml normal, el volumen ideal para su aspiración es aproximadamente 3,0 ml. Preferentemente, durante la recogida de las células mononucleares de la capa de células, se produce movimiento lateral relativo (en el plano X/Y) entre la punta de la sonda y el tubo, mostrado por las flechas que se extienden lateralmente en la etapa (e), de manera que se aspiran células en diferentes emplazamientos laterales dentro de la capa de células. En un instrumento programable del tipo que se ha descrito, puede programarse la sonda, por ejemplo, para escribir un "ocho" o un patrón en espiral, comenzando en el centro del tubo en el que están situadas la mayor parte de las células durante la recogida de las células.

En un proceso automático, la recogida de las células se consigue haciendo avanzar la punta de la sonda de aspiración/dispensación en el tubo a una distancia predeterminada D, que corresponde al nivel mínimo en el que se espera que aparezca el fondo de la capa de CM en el tubo. Este nivel mínimo, indicado por la distancia X (presentado en la etapa (e) de la Figura 2) se mide desde el fondo del tubo. Dicho nivel puede determinarse tanto por

cálculo como por mediciones empíricas realizadas en multitud de muestras. Dado que el diámetro del tubo es una constante, al igual que los parámetros de la etapa de centrifugación y los volúmenes correspondientes de la muestra de sangre y el material de gradiente de densidad que se añade al tubo, la capa de CM aparecerá siempre a la misma distancia mínima desde el fondo de tubo, más una pequeña desviación (que corresponde a la distancia d).
 5 Esta desviación puede estar causada por ligeras variaciones del tamaño de tubo (debido a las tolerancias de fabricación) y ciertas características de la muestra de sangre que afectan, por ejemplo, a la densidad del aglomerado P de los glóbulos rojos y los granulocitos formados en el fondo del tubo tras la centrifugación. En un tubo de centrifugación de 15 ml normal, que tiene un diámetro de 15 mm, la distancia d corresponde a un volumen de 0,3 ml. Por tanto, al recoger las células de la capa de células CM, se hace avanzar la sonda de aspiración/dispensación a una distancia D en el tubo y se aspiran 3,0 ml de líquido. En el caso, tal como se muestra en el dibujo, de que el fondo de la capa de CM esté a su desviación máxima desde su nivel mínimo, es decir una distancia X + d desde el fondo del tubo, los primeros 0,3 ml del líquido aspirado comprenderán principalmente solución de gradiente de densidad y un número de células mononucleares relativamente reducido; sin embargo, debe advertirse que la velocidad a la que se recogen dichas células aumentará continuamente, a medida que se mueva la capa de células CM (descendiendo) hacia el puerto de aspiración de la muestra durante la aspiración. Después de que se hayan aspirado 0,3 ml de líquido, el puerto de aspiración de la sonda estará ahora completamente sumergido en la capa de células y solamente se aspirarán las células mononucleares para los sucesivos 2,7 ml del líquido de aspiración. En el caso en el que el fondo de la capa de CM esté situado inicialmente al nivel mínimo, es decir, una distancia X del fondo del tubo, la punta de la sonda coincidirá con el fondo de la capa de CM y las células mononucleares se recogerán de la capa de células durante la aspiración de los 3,0 ml de en su totalidad.

Después de aspirar un volumen predeterminado de líquido del tubo, conteniendo la mayor parte del mismo las células mononucleares de interés, se separa lentamente la sonda del tubo y se dispensa el líquido aspirado en un tubo de centrifugación TC, p.ej., un tubo de centrifugación de 50 ml. A continuación, se diluyen las células recogidas con PBS, se centrifugan para formar un aglomerado, se lavan para eliminar cualquier material de densidad de gradiente residual, se vuelven a suspender en PBS y se analizan en cuanto a la viabilidad.

Se puede deducir de lo anterior que el método de la invención se presta fácilmente por sí mismo a la automatización mediante el uso de un aparato de aspiración y dispensación de líquido programable del tipo empelado en un instrumento de preparación de muestras PrepPlus. Si bien no tiene como fin la preparación de muestras para la separación y recogida de células, el instrumento PrepPlus, cuando se programa y se modifica convenientemente tal como se ha descrito, se adapta perfectamente para llevar a cabo el método de la invención gracias a su capacidad para trasladar una sonda de aspiración y dispensación líquida en tres dimensiones (X/Y/Z), para situar con precisión la sonda a la profundidad deseada en el recipiente en el que se lleva a cabo el método, y para aspirar y dispensar líquidos a velocidades cuidadosamente controladas para evitar cualquier sustancial turbulencia en la punta de la sonda. El hecho de que el método de la invención, cuando se automatiza, pueda conseguir resultados que son iguales o mejores a los resultados obtenidos a través del método manual convencional para recoger células es evidente según los siguientes gráficos, gráficos de barras, histogramas y gráficos de dispersión.

El gráfico de barras y el gráfico combinados de la Figura 5 comparan el porcentaje de células recuperadas (es decir, recogidas) desde muestras de sangre entera periférica proporcionada por 13 donantes diferentes utilizando tanto el método de separación y recogida de células manual descrito haciendo referencia a la Figura 1, como el método de la invención, automatizado utilizando el instrumento PrepPlus antes señalado. Se normalizaron los resultados de la recuperación de células para el método automático con los resultados manuales para la muestra correspondiente. Cada uno de los resultados se muestra como el promedio (sobre la base de duplicados o triplicados por donante) \pm la desviación típica. Los resultados de la viabilidad para el método automático se muestran como el promedio de tres replicados para cada donante. Se obtuvieron todos los resultados de viabilidad utilizando un analizador de viabilidad de células Vi-Cell™ XR (Beckman Coulter, Inc.). Los resultados de la viabilidad celular para el método manual fueron comparables ($\Delta \leq 3\%$) a los del método automático (no se muestran los datos). Los resultados de concentración celular son el promedio de tres replicados por cada muestra determinada automáticamente utilizando un analizador Vi-Cell XR. Las mediciones se basan en partes alícuotas de 100 microlitros de células diluidas en 2-2,5 ml de PBS o mEM/10 %FCS. Las condiciones del protocolo de Vi-Cell para todos estos resultados se describen en la bibliografía del producto.

En los histogramas de las Figuras 6A y 6B, se muestra una comparación fenotípica de las células recogidas a través del método manual de la técnica anterior y el método automatizado de la invención. Estos resultados ilustrados son para marcadores representativos para un donador sometido a caracterización fenotípica. Se tiñeron PBCM (células mononucleares de sangre periférica) obtenidas a través de los métodos manual y automático, del mismo donante, en dos tubos que contenían varios anticuerpos monoclonales, cada uno de ellos conjugado con un fluorocromo. El Tubo no. 1 contenía 50 μ l de células ($2-3 \times 10^6$ células/ml) y 10 o 20 μ l de CD14-ITC, CD19-PE, CD3-ECD, CD56-PC5, y CD45-PC7, 2); el Tubo no.2 contenía 50 μ l de células ($2-3 \times 10^6$ células/ml) y 10 o 20 μ l de CD19-FITC, CD3-PE, CD45-ECD, CD8-PC5 y CD4-PC7. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añadieron 4 ml de PBS. A continuación, se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se volvió a suspender el aglomerado de células resultante en 0,5 ml de PBS. Se analizaron todas las muestras en el aparato de citometría de flujo Cytomics FC500™ (Beckman Coulter, Inc.) basado en un protocolo para la pre-selección en linfocitos y células CD45⁺ durante un total de 300 segundos. Tal como se podrá deducir de los histogramas de las Figuras 6A y 6B,

aparentemente, los dos métodos para recoger células, se correlacionan bien por lo que respecta a sus correspondientes caracterizaciones fenotípicas.

El gráfico de barras de la Figura 7 compara el porcentaje de células mononucleares que se han determinado como positivas para cada uno de los siete conjugados de anticuerpos/tinción fluorescente diferentes. Para cada uno de los conjugados, las barras oscuras representan el porcentaje de células recogidas a través del método automático de la invención y las barras claras representan las células recogidas mediante el método manual. Estos datos se basan en cuatro donantes representativos sometidos a perfil fenotípico. Cada uno de los puntos de datos representa el promedio \pm la desviación típica sobre la base de duplicados o triplicados para cada condición de análisis por donante. Se tiñeron todas las muestras y se analizaron en el cytomics FC500 (los métodos para la preparación y análisis de la muestra se detallan en otra parte). Tal como queda indicado, los resultados son llamativamente similares, lo cual indica que el método de la invención no tiene efectos adversos, o muy pocos, en la recogida de células frente al método manual.

Los gráficos de dispersión de las Figuras 8A y 8B respectivamente ilustran un análisis de citoquinas intracelular de PBCM que han sido aisladas a través del método automático de la invención y a través del método manual de la técnica anterior. Los resultados son representativos de un experimento en el que se sometieron a idéntica estimulación, preparación de muestra y análisis PBCM aisladas, automáticamente y manualmente del mismo paciente. *Estimulación.* Se dejaron en reposo durante toda la noche PBCM recién aisladas a $5-10 \times 10^6$ células/ml en RPMI 1640/10%FCS/pen/strep, 37 °C, y CO₂ 5 %. A continuación, se estimularon las células con enterotoxina-B de estafilococos (SEB) y anti-CD28 a concentraciones finales de 2 y 3 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Al cabo de 2 horas, se añadió Brefaldin A a una concentración final de 5 $\mu\text{l/ml}$ y se incubaron las células durante 16 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. SE llevó a cabo la *tinción de la superficie celular e intracelular* utilizando un método modificado y automático utilizando un reactivo de permeabilización IntraPrep™ (Beckman Coulter, inc.). Los reactivos de tinción de la superficie celular e intracelular incluyeron IFN γ -FITC, IL2-PE, CD8-ECD, CD3-PC5, CD4- PC7. Se analizaron todas las muestras en un aparato de citometría Cytomics FC500 utilizando un protocolo predefinido con una selección inicial en linfocitos y células CD3⁺ y un tiempo de análisis total de 300 segundos.

Se puede deducir de los ejemplos expuestos que el método automático de la invención proporciona células que son comparables con las células recogidas manualmente por lo que respecta al número, viabilidad, perfil fenotípico y caracterización de la función celular. Los datos muestran que el método automático de la invención puede recuperar de forma rutinaria más de un 93 % del número de células conseguido con el mejor método manual.

En la descripción expuesta, se señala que es deseable producir un movimiento lateral (es decir, en el plano X/Y) durante la aspiración de la capa de células con el fin de recoger células de diferentes emplazamientos en la capa. Un enfoque alternativo es realizar varias aspiraciones, desplazando cada vez el punto de entrada de la sonda de aspiración en la capa de células. Por ejemplo, las aspiraciones primera y segunda se pueden realizar en el centro geométrico del tubo (en el plano X/Y), que es en el que se congregan más células de interés tras la centrifugación. A continuación, pueden realizarse cuatro aspiraciones más en cada uno de los cuatro cuadrantes circundantes. En esta realización, el volumen total aspirado a través de seis aspiraciones equivaldrá a una sola aspiración realizada durante la etapa de recogida de células que se ha descrito.

Si bien la invención ha sido descrita haciendo referencia a la recogida de células mononucleares, podrá apreciarse que es posible separar y recoger otros tipos de células seleccionado apropiadamente el material gradiente. Asimismo, pueden separarse y recogerse otros tipos de células dentro del mismo tubo de sangre entera aplicando un método de gradiente de densidad discontinuo. Por ejemplo, haciendo referencia a la Figura 3, pueden sub-estratificarse en un tubo T dos materiales de gradiente de densidad diferentes, DG1 y DG2. Se puede formular DG1 para aislar células mononucleares (CM), al mismo tiempo que se puede formular DG2 para aislar células polimorfonucleares (CPMN), que tienen una mayor densidad de 1,12 g/ml. Al igual que en el método descrito haciendo referencia a la Figura 2, la sonda de aspiración/dispensación utilizada para sub-estratificar la muestra de sangre con el(los) material(es) de gradiente de densidad se encuentra en un preparador de muestra automático, p.ej., el instrumento PrepPlus antes explicado. Se programa la sonda para dispensar secuencialmente, cada vez en el fondo del tubo, primero el material de gradiente de densidad que tiene la densidad más baja (DG1) y después el material de densidad más alta DG2. Una vez sub-estratificada la muestra de sangre con los dos materiales de gradiente de densidad, se somete el contenido del tubo a centrifugación que funciona para separar las células de interés en dos capas de células diferenciadas, formándose la capa de CM encima de DG1 y formándose la capa de CPMN encima de DG2. A continuación, se retorna el tubo al instrumento de preparación de muestras donde se programa la sonda de aspiración para (a) avanzar primero a un nivel levemente por debajo (a una distancia d) de la posición nominal de la capa de CM y para aspirar y dispensar las células tal como se ha descrito hasta obtener un volumen deseado de la capa de CM y, a continuación, tras el lavado de la sonda, para (b) avanzar a un nivel levemente más bajo (de nuevo a la distancia d) de la posición nominal de la capa de CPMN y para aspirar y dispensar células tal como se ha descrito.

Se ha descrito la invención haciendo referencia a realizaciones preferentes. Deberá entenderse, sin embargo, que es posible introducir diversas modificaciones y cambios sin por ello alejarse del alcance de la invención, tal como queda definido en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para separar y recoger células de interés de una muestra de sangre entera comprende las etapas de:
 - 5 (a) depositar un volumen predeterminado de una muestra de sangre entera diluida en un tubo;
 - (b) dispensar un volumen predeterminado de una solución de gradiente de densidad a una velocidad predeterminada en el fondo de dicho tubo, proporcionando así una capa de una solución de gradiente de densidad que está debajo de dicha muestra de sangre diluida, teniendo dicha solución de gradiente de densidad una densidad igual o superior a la densidad de dichas células de interés;
 - 10 (c) centrifugar el contenido de dicho tubo para producir una capa de células que comprende las células de interés, estando situada dicha capa de células dentro del tubo en un emplazamiento que está encima de dicha solución de gradiente de densidad dentro de dicho tubo,
 - (d) hacer avanzar el extremo distal de una sonda de aspiración/dispensación a un emplazamiento predeterminado dentro de dicho tubo en la que un puerto de aspiración/dispensación, situado en dicho extremo distal de dicha sonda, está debajo de dicha capa de células a no más de una distancia predeterminada y
 - 15 (e) aspirar un volumen predeterminado de un líquido desde dicho tubo al mismo tiempo que la sonda permanece en dicho emplazamiento predeterminado, siendo dicho volumen predeterminado suficiente para (i) descender el nivel de dicha capa de células a un nivel en el que queda sumergida dicha sonda en dicha capa de células y (ii) permitir que el puerto de sonda permanezca en la capa de células hasta que dicho volumen de líquido predeterminado haya sido aspirado.
2. El método tal como se define según la reivindicación 1, donde se proporciona un movimiento lateral relativo predeterminado entre dicha sonda y dicho tubo para aspirar células de interés desde diferentes porciones de dicha capa de células.
- 25 3. El método tal como se define según la reivindicación 2, donde dicho movimiento lateral predeterminado se proporciona moviendo dicha sonda en relación con dicho tubo.
4. El método tal como se define según la reivindicación 1, donde dicha etapa de dispensación se consigue haciendo avanzar la punta de dicha sonda de aspiración/dispensación a través de la muestra de sangre entera depositada en el fondo del tubo; y dispensando un volumen predeterminado de dicha solución de gradiente de densidad en el fondo de dicho tubo a través de la punta de la sonda de aspiración/dispensación.
- 30 5. El método tal como se define según la reivindicación 4, donde se hace avanzar dicha sonda a una distancia predeterminada hacia dicho tubo para dispensar dicha solución de gradiente de densidad en el fondo del tubo.
- 35 6. El método tal como se define según la reivindicación 4, donde se dispensa dicha solución de gradiente de densidad a una velocidad predeterminada para reducir al mínimo las turbulencias en la muestra de sangre entera previamente depositada.
- 40 7. El método de la reivindicación 4, donde la etapa (e) comprende las etapas de:
 - (i) aspirar un primer volumen predeterminado de la solución de gradiente de densidad desde el tubo a través de la punta de sonda, siendo suficiente dicho volumen predeterminado para hacer descender el nivel de la capa de células dentro del tubo a un nivel en el que se sumerge la punta de la sonda en dicha capa de células al terminar dicha aspiración;
 - (ii) separar la sonda de aspiración/dispensación del tubo y dispensar el contenido de la sonda en un recipiente;
 - (iii) hacer avanzar de nuevo la punta de una sonda de aspiración/dispensación en el tubo a la misma distancia predeterminada para situar la punta de la sonda dentro de la capa de células,
 - 50 (iv) aspirar un volumen predeterminado de células desde la capa de células a través de la punta de la sonda y dispensar las células aspiradas en dicho recipiente, y
 - (v) repetir las etapas (iii) y (iv) para proporcionar el volumen predeterminado deseado de células de interés en dicho recipiente.
- 55 8. El método tal como se define según la reivindicación 7, donde el movimiento lateral relativo entre dicha sonda y dicho tubo se efectúa entre sucesivas aspiraciones de dicha capa de células para retirar las células de diferentes porciones de dicha capa de células.
- 60 9. El método de la reivindicación 1, para recoger células de interés primeras y segundas de una muestra de sangre entera, siendo dichas células primeras y segundas de diferentes tipos, teniendo dicho segundo tipo de células una densidad que es mayor que la densidad de dicho primer tipo de células, donde la etapa (b) comprende:
 - (i) dispensar un volumen predeterminado de dicha primera solución de gradiente de densidad a una velocidad predeterminada en el fondo de dicho tubo, con lo cual se proporciona una capa de dicha primera solución de gradiente de densidad que está debajo de dicha muestra de sangre entera, teniendo dicha primera solución de gradiente de densidad una densidad igual o superior a la densidad de dicho primer tipo de células de interés;
 - 65

(ii) dispensar un volumen predeterminado de una segunda solución de gradiente de densidad a una velocidad predeterminada en el fondo de dicho tubo, con lo cual se proporciona una capa de dicha segunda solución de gradiente de densidad que está debajo de dicha capa de dicha primera solución de gradiente de densidad, teniendo dicha segunda solución de gradiente de densidad una densidad igual o superior a la densidad de dicho segundo tipo de células de interés;

y donde la etapa (c) comprende centrifugación de dicho contenido del tubo para producir las capas de células primera y segunda que están separadas por un espacio en dicho tubo por dicha capa de dicha primera solución de gradiente de densidad, comprendiendo dicha primera capa de células predominantemente dichas primeras células de interés que comprenden las células de interés, estando situada dicha capa de células dentro del tubo en un emplazamiento que está sobre dicha solución de gradiente de densidad dentro de dicho tubo y donde las etapas (d) y (e) se repiten secuencialmente para aspirar las capas de células primera y segunda respectivamente.

10. El método tal como se define según la reivindicación 9 donde se proporciona un movimiento lateral relativo predeterminado entre dicha sonda y dicho tubo para aspirar células de interés de diferentes porciones de dicha capa de células.

11. Aparato para preparar una muestra de sangre entera para la separación de células y para recoger células de la capa de células, comprendiendo dicho aparato:

(a) una plataforma de trabajo;

(b) una sonda de aspiración/dispersión que tiene un puerto en el extremo distal del mismo a través del cual se puede aspirar hacia dicha sonda y dispensar desde ella líquido,

(c) una montura X/Y/Z para soportar dicha sonda por encima de dicha plataforma de trabajo para su movimiento a lo largo de los tres ejes perpendiculares entre sí;

(d) un impulsor de sonda para hacer avanzar selectivamente dicha sonda a lo largo de dichos ejes;

(e) una bomba bidireccional para aspirar o dispensar selectivamente líquido a través de dicho puerto de sonda; y

(f) un controlador programable para controlar el funcionamiento del transmisor de sonda y la bomba bidireccional para llevar a cabo un proceso para preparar una muestra de sangre entera para separación de células y, tras dicha separación de células, para recoger células de un tipo en particular desde dicha muestra de sangre entera, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

(i) depositar un volumen determinado de una muestra de sangre entera diluida en un tubo;

(ii) dispensar un volumen predeterminado de una solución de gradiente de densidad a una velocidad predeterminada en el fondo de dicho tubo, proporcionando así una capa de solución de gradiente de densidad que está debajo de dicha muestra de sangre diluida, teniendo dicha solución de gradiente de densidad una densidad igual o superior a la densidad de las células de un tipo en particular, con lo cual se prepara la muestra de sangre entera para un proceso de centrifugación fuera de línea en el que se produce una capa de células que contiene dichas células de un tipo particular;

(iii) centrifugar dicho contenido del tubo para producir una capa de células que comprende las células de interés, estando situada dicha capa de células dentro del tubo en un emplazamiento que está sobre dicha solución de gradiente de densidad dentro de dicho tubo;

(iv) hacer avanzar el extremo distal de la sonda de aspiración/dispensación a un emplazamiento predeterminado dentro de dicho tubo en el que un puerto de aspiración/dispensación situado en el extremo distal de dicha sonda está debajo de dicha capa de células a no más de una distancia predeterminada, y

(v) aspirar un volumen predeterminado de líquido desde dicho tubo al mismo tiempo que permanece la sonda en dicho emplazamiento predeterminado, siendo suficiente dicho volumen predeterminado para (i) hacer descender el nivel de dicha capa de células a un nivel en el que dicho puerto de sonda queda sumergido en dicha capa de células, y (ii) permitir que el puerto de sonda permanezca en la capa de células hasta que dicho volumen predeterminado de líquido se haya aspirado.

12. El aparato tal como se define según la reivindicación 11, donde se proporciona un movimiento lateral relativo predeterminado entre dicha sonda y dicho tubo para aspirar células de interés desde diferentes porciones de dicha capa de células.

13. El aparato tal como se define según la reivindicación 12 donde dicho movimiento lateral relativo predeterminado se proporciona moviendo dicha sonda en relación con dicho tubo.

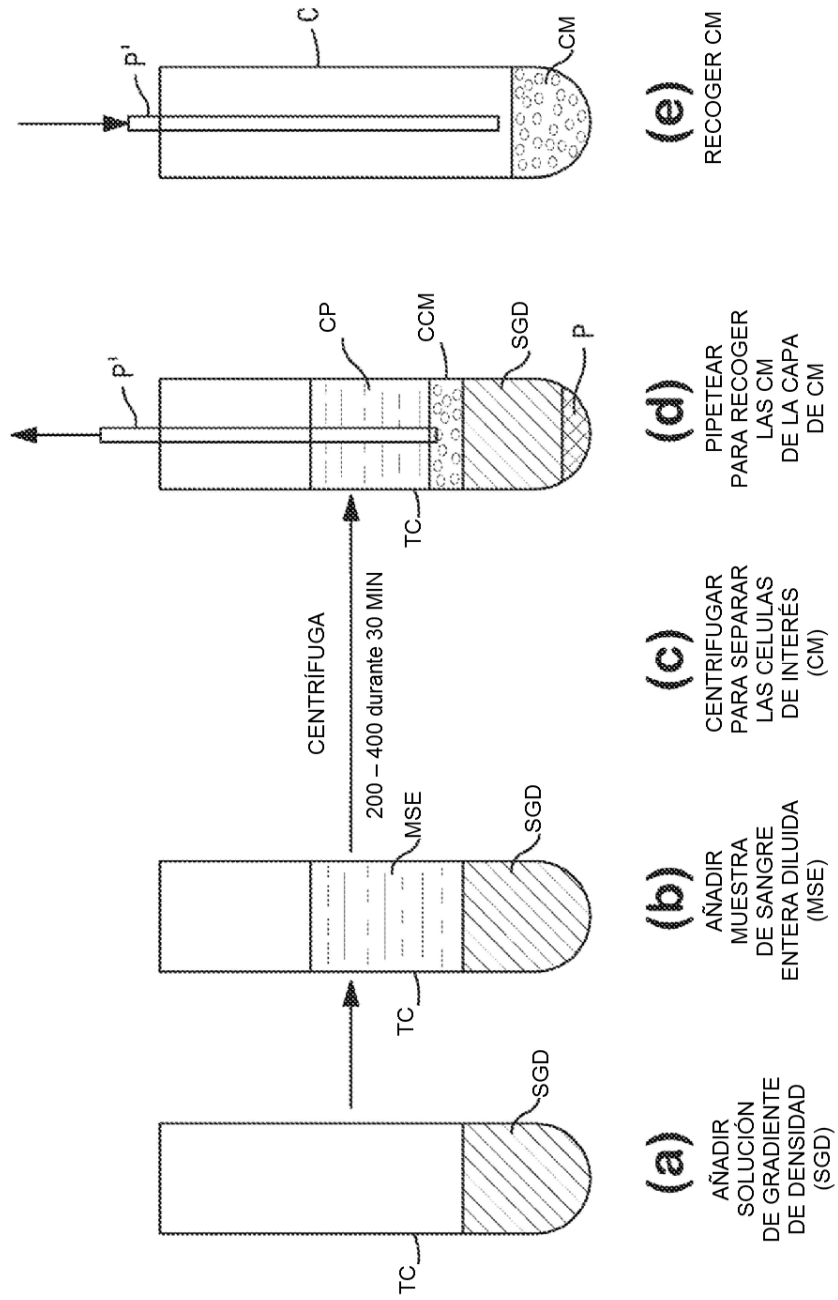


FIG.1
(TÉCNICA ANTERIOR)

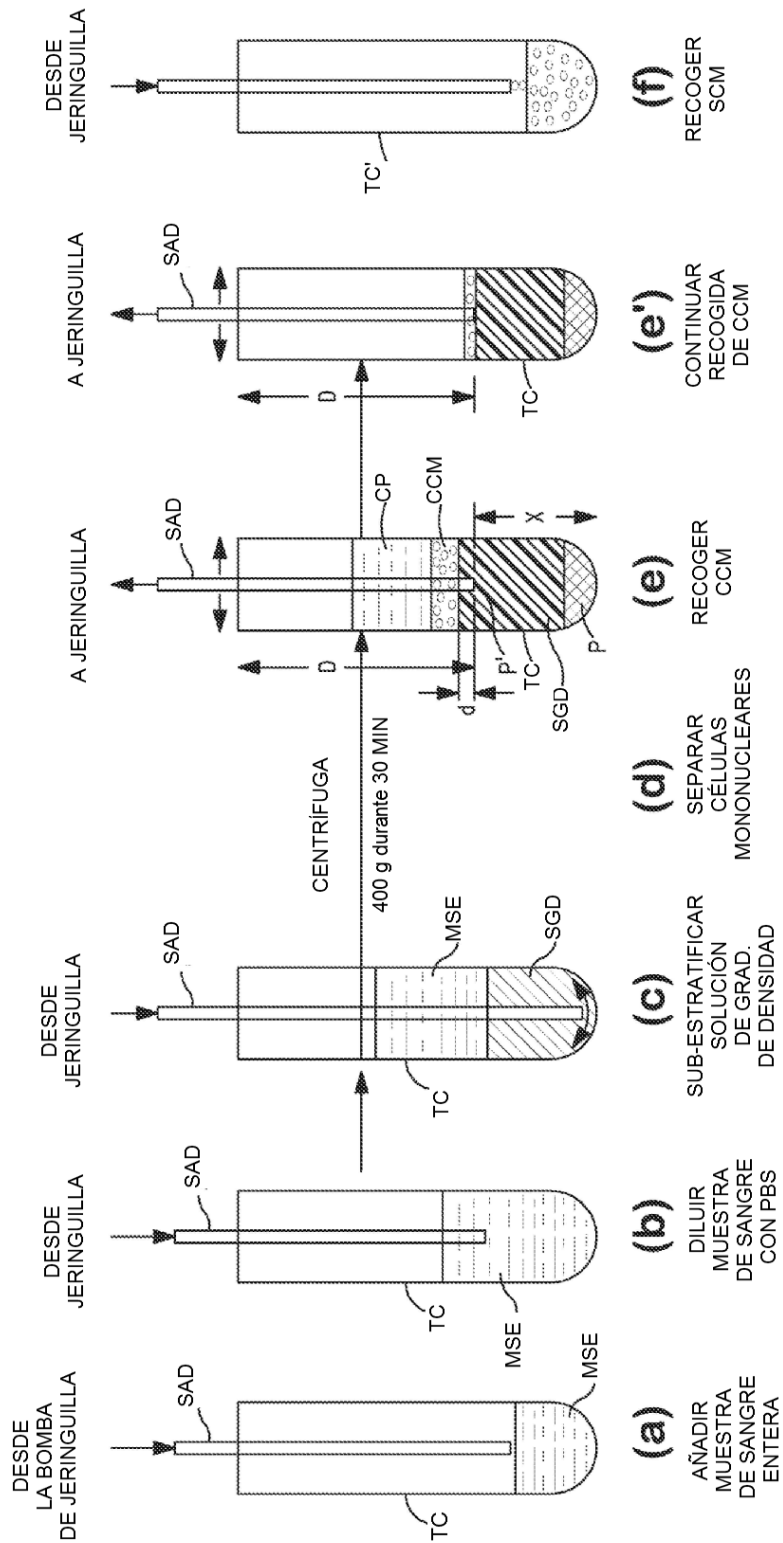


FIG. 2

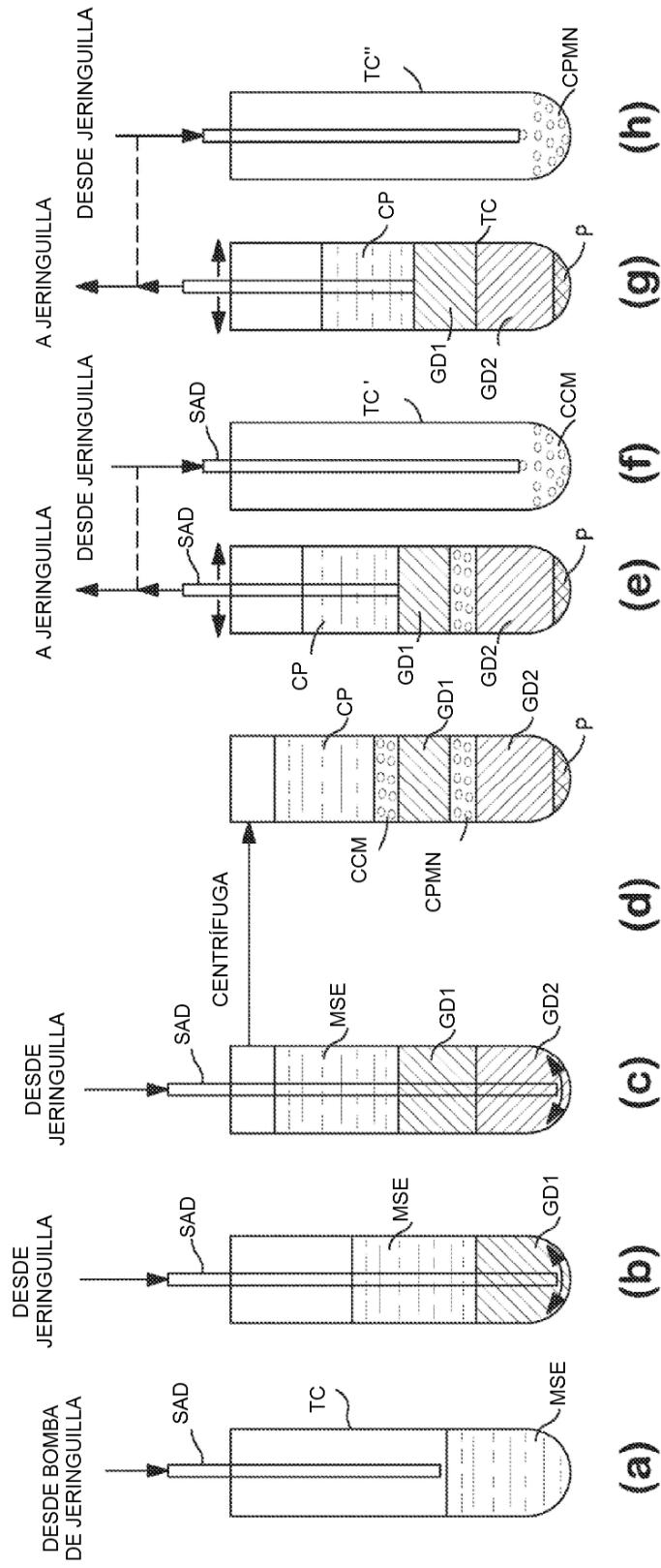


FIG. 3

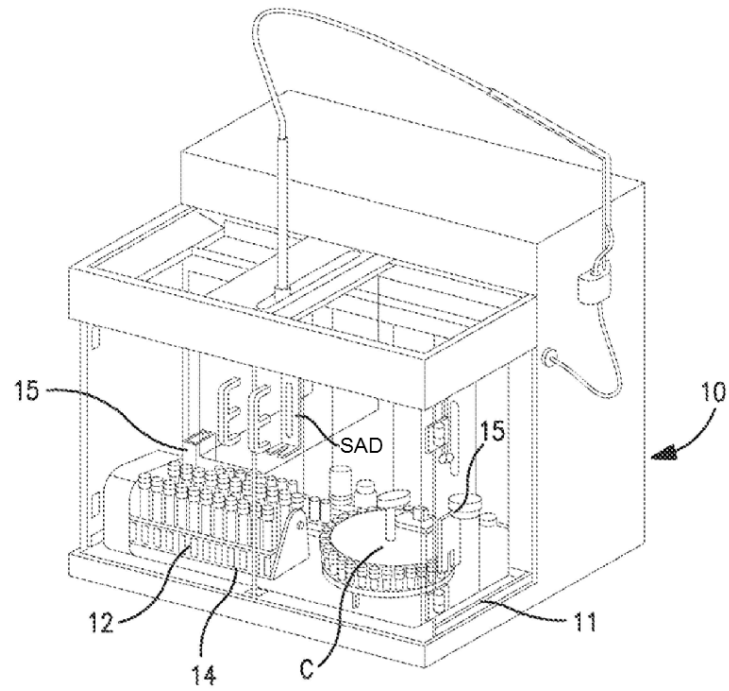


FIG. 4A

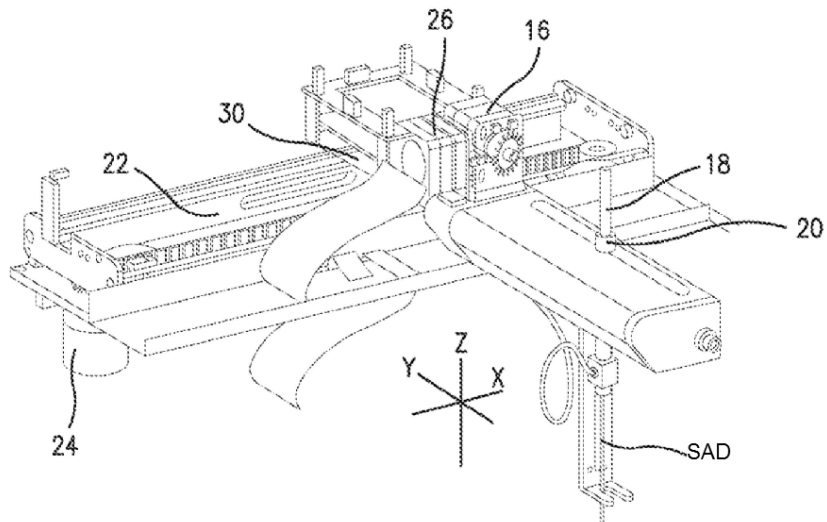


FIG. 4B

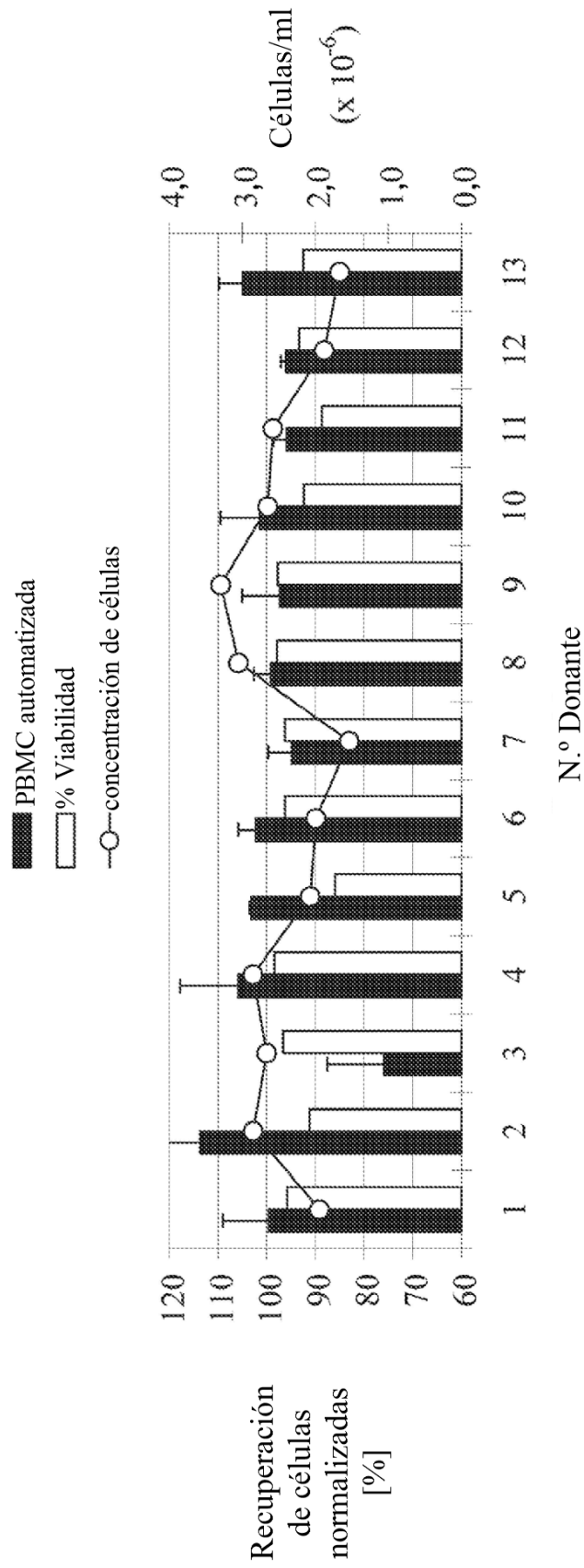
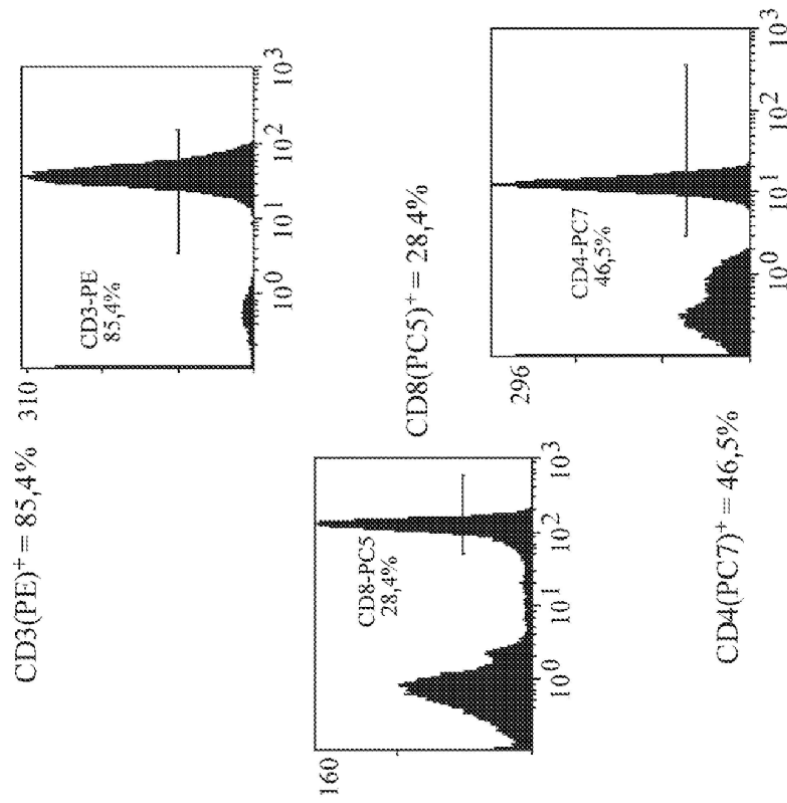


FIG. 5

Proceso manual



Proceso automatizado

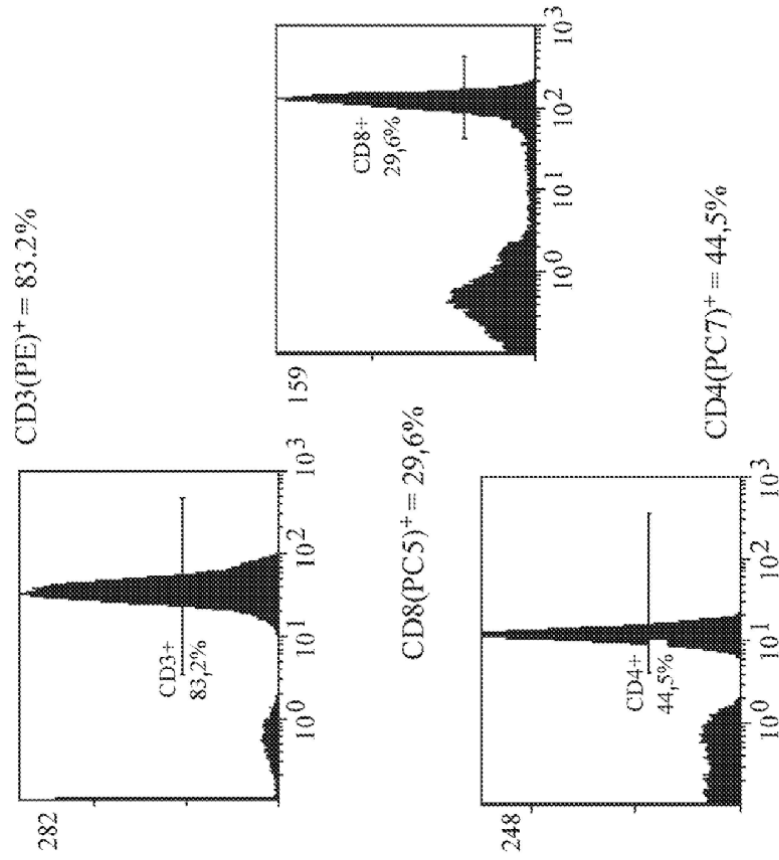


FIG. 6A

FIG. 6B

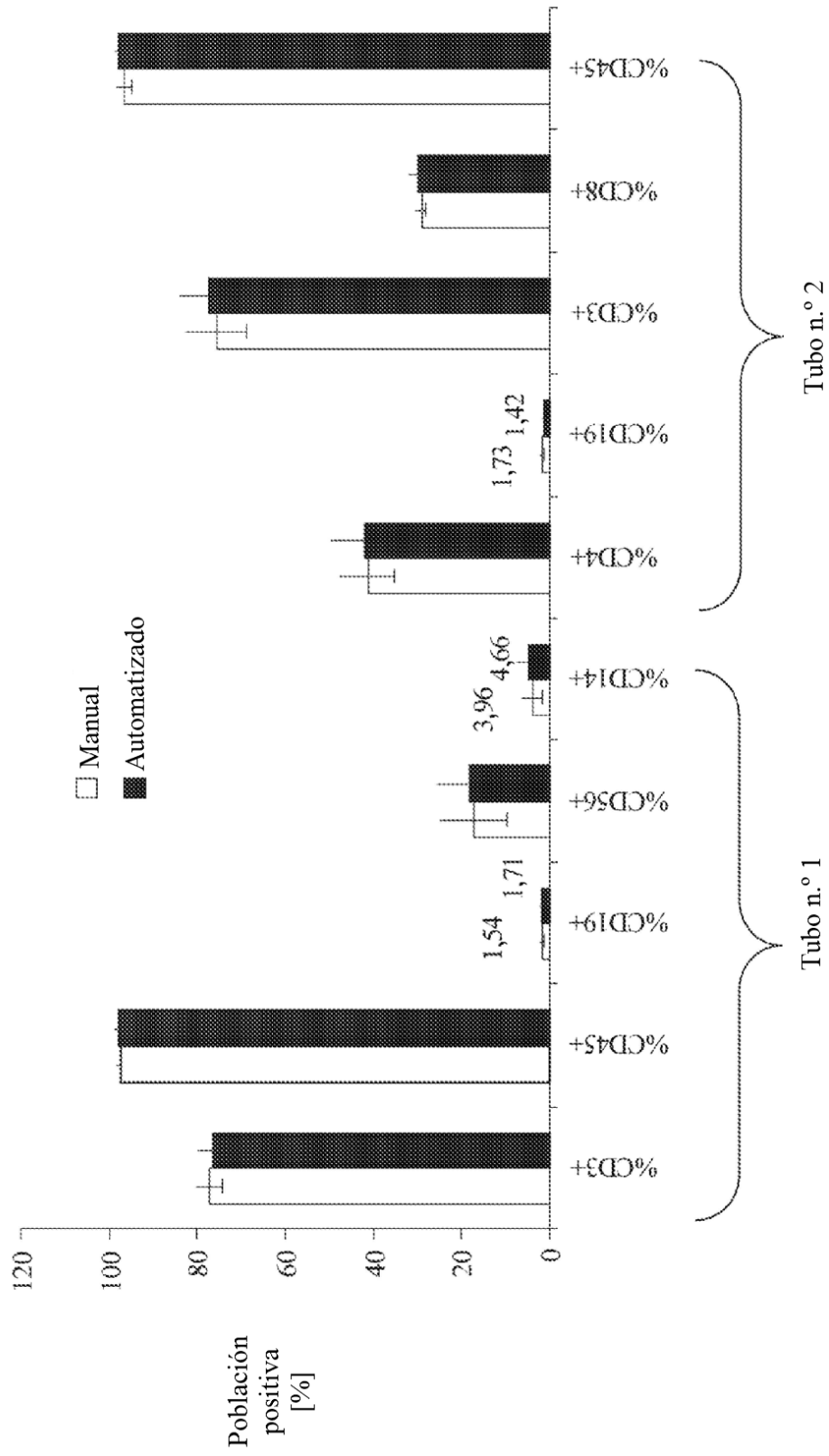


FIG. 7

Proceso automatizado

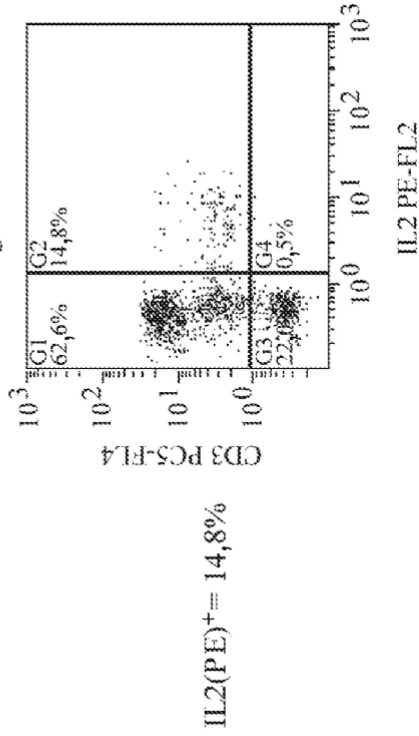
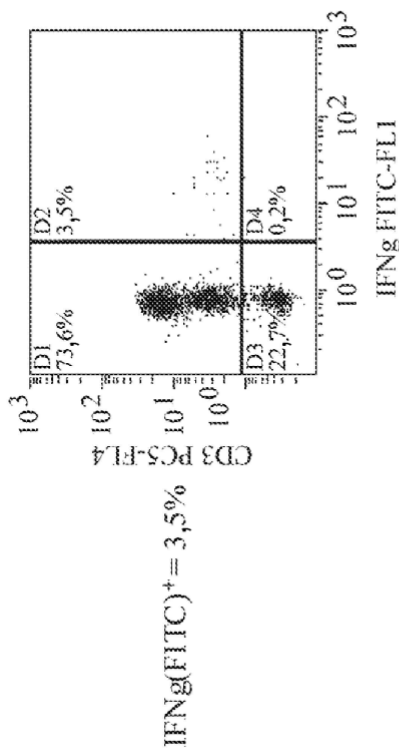


FIG.8A

Proceso automatizado

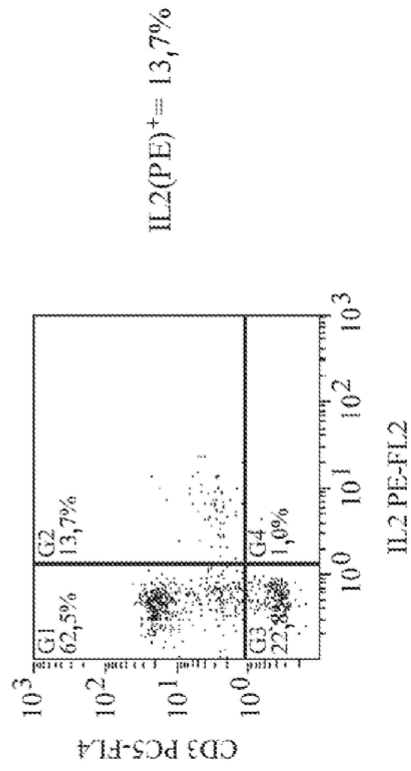
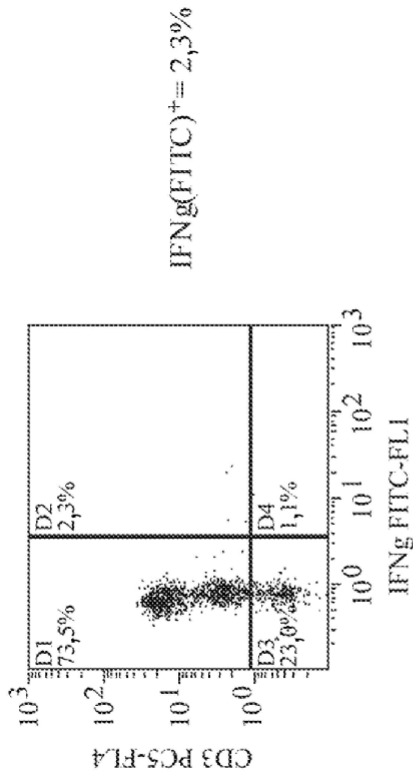


FIG.8B