



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00448

(22) Data de depozit: 29/06/2015

(41) Data publicării cererii:
27/11/2015 BOPI nr. 11/2015

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "VICTOR BABEȘ" DIN
TIMIȘOARA, PIAȚA EFTIMIE MURGU
NR.2 A, TIMIȘOARA, TM, RO

(72) Inventatori:
• VĂDUVA ADRIAN OVIDIU,
STR. PAVEL DAN NR. 41B, TIMIȘOARA,
TM, RO

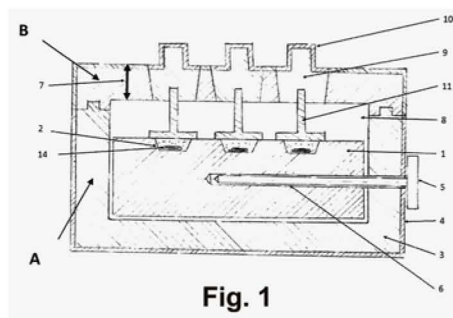
(54) DISPOZITIV ȘI METODĂ PENTRU CRIOINCLUDERE A
MATERIALULUI TISULAR ÎN VEDEREA EXAMINĂRII
MICROSCOPICE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un dispozitiv portabil și la o metodă pentru crioinclusiune a unui material tisular, în vederea examinării microscopice, utilizată în special în spitale și în laboratoarele de cercetare. Dispozitivul conform invenției este alcătuit dintr-o cuvă (A) care, împreună cu un capac (B) de carcasă, determină un spațiu interior pentru o cameră de înghețare, izolată termic printr-un strat (3) izolator în cuvă (A), și printr-un strat (7) superior în capacul (B) de carcasă, în cuvă (A) fiind montat un bloc (1) din metal cu conductivitate termică și căldură specifică crescută, de regulă, din aluminiu, prevăzut pe o parte cu niște locașuri (2) tronconice, cu rolul cavităților formatoare, pentru includerea unor țesuturi în masa de gheață. Metoda conform invenției constă în introducerea și menținerea dispozitivului fără capacul de carcasă, într-un congelator de temperatură ultrajoasă, până la obținerea temperaturii de -80°C a unui bloc din metal, montarea capacului de carcasă și a unor piese port-obiect la deschiderea congelatorului și înainte de a scoate restul ansamblului din mediu de -80°C , transportarea dispozitivului în condiții normale la locul recoltării, apoi, în momentul în care este necesară operațiunea de includere, se detașează capacul, se așază în cuva de includere în cavitățile formatoare fragmentul de țesut de interes, peste care se toarnă mediul de înghețare, după care se așază deasupra piesele port-obiect și capacul de tip carcasă, mediul de

înghețare situat deasupra planului blocului intrând în șanțurile piesei port-obiect și facilitând legarea eșantioanelor cu material tisular, după înghețare, prin rotirea tijei piesei port-obiect, se obține detașarea blocului de gheață cu material tisular înglobat și, în final, piesa port-obiect cu șanțuri unidirectionale permite ca, prin presarea blocului de gheață, cu material tisular înglobat, să se obțină detașarea acestuia, putând fi utilizat imediat, sau stocat pentru utilizare ulterioară.

Revendicări: 5
Figuri: 2



a 2015 00448

29-06-2015

24

DISPOZITIV ȘI METODĂ PENTRU CRIOINCLUDERE A MATERIALULUI TISULAR ÎN VEDEREA EXAMINĂRII MICROSCOPICE.

Invenția se referă la un dispozitiv portabil destinat crioîncluderii materialului tisular în vederea examinării microscopice utilizată cu precădere în spitale și laboratoare de cercetare.

Este cunoscut din practica medicală și literatura de specialitate că materialul tisular recoltat intra operator poate fi înghețat folosind un mediu de includere de tipul OCT – Sakura Tek (optimum cutting temperature compound – amestec apos de glicoli și rășini) pentru a fi apoi secționat și examinat în microscopie optică în vederea punerii unui diagnostic intra operator (examen extemporaneu). De asemenea, multe tehnici de cercetare și diagnostic necesită procesarea materialului tisular în stare înghețată. În principal sunt folosite două metode:

- înghețare la -20°C urmată de secționare imediată,
- înghețare la -80°C , urmată de stocare în congelatoare de temperatură ultra joasă (ultralow temperature freezer). Stocarea la -80°C permite temporizarea secționării materialului ceea ce înseamnă că materialul rămâne viabil câteva luni. În momentul procesării blocul de gheață ce conține țesutul trebuie încălzit la -20°C pentru a putea fi prelucrat, temperatura de prelucrare poate varia în funcție de țesut.

Pentru ambele procedee este necesar ca timpul de înghețare să fie redus pentru a limita inducerea de artefacte de înghețare (cristalele aciculare de gheață) care rup membranele celulelor denaturând proba cu material tisular de cercetat.

În mod uzual, pentru procesarea de înghețare (sau „la gheață”) a fragmentelor de țesut, procedura de înghețare se realizează în interiorul criotomului, aparatul care realizează și sectionarea materialului rezultat. Se folosește o piesă “port obiect” peste care se depune un strat de mediu de înghețare (OCT – optimum cutting temperature compound), iar în acesta se așează țesutul de interes pentru investigare medicală sau în scop de cercetare. Piesa port obiect astfel formată este introdusă în camera criotomului la o temperatură medie de -20°C pentru a îngheța țesutul de investigat. Răcirea poate fi grăbită prin folosirea extractoarelor de căldură (piese metalice cu suprafață plană) care se pun peste piesa „port obiect” de înghețat. Ulterior înghețării se poate efectua în bune condițiuni sectionarea mecanică a materialului tisular și etalarea pe lama folosită ca suport pentru explorarea microscopică.

Dezavantajele acestei tehnici uzuale sunt următoarele:

- răcirea se produce mai lent și facilitează apariția artefactelor induse de îngheț;
- necesită un criotom, aparat voluminos, dificil de transportat în diverse locații;
- materialul recoltat trebuie transportat de la locul recoltării până în laboratorul de procesare și în acest interval de timp intermediar unii compuși intracelulari cu durata de viață scurtă pot fi deja metabolizați și nu mai pot fi evidențiați.
- în general nu se recomandă că materialul înghețat intermediar la -20°C să fie apoi stocat la -80°C .
- Pentru stocare la -80°C , metoda cea mai răspândită este de a îngheța rapid piesa în azot lichid, tehnică ce necesită personal calificat și proceduri speciale de manevrare a agentului frigorific.

Este cunoscută invenția US2002162337(A1) intitulată „Apparatus and method for precision cryoembedding of tissue samples” în care în scopul crioîncluderii țesutului tisular de investigat se folosește un aparat ce constă într-un ansamblu compus dintr-un set de cuve de

includere, port-piese și blocuri de răcire ce se introduc peste port-piese, cu accesorii de manipulare a pieselor. Aparatul poate fi răcit de surse externe sau utilizat în interiorul unui criotom. Aparatul este destinat a fi folosit la -25°C - -30°C . Dezavantajele acestui aparat sunt următoarele:

- aparatul nu poate fi folosit pentru a produce blocuri de gheață ce includ material tisular la o temperatură mai joasă de -30°C . Pentru stocarea de lungă durată a materialului tisular este necesară înghețarea la -80°C într-o singură etapă și cât mai rapid posibil;
- aparatul nu prezintă înveliș izolator ceea ce face că încălzirea dispozitivului să fie rapidă, iar intervalul de folosire în afară unei incinte răcite (de tipul criotomului) este limitat;
- aparatul prezintă un număr mare de piese mobile;
- aparatul nu este dotat cu un termometru propriu pentru monitorizarea temperaturii de includere.

Se cunoaște de asemenea invenția WO2007028243 (B1) ce utilizează un aparat și o metodă constând dintr-o platforma de înghețare introdusă într-o cutie izolatoare din polistiren, o matrița de înghețare și un port obiect. Aparatul în general este răcit cu zăpadă carbonică, dar poate folosi și alte surse, cum este azotul lichid sau compresor propriu de răcire. Dezavantajele acestui aparat sunt următoarele:

- unele surse de răcire necesită material adițional și eventual personal calificat în manevrarea lor (zăpadă carbonică, azot lichid);
- învelișul izolator este din polistiren, care este inferior poliuretanului din punct de vedere al calităților izolatoare și a rezistenței la manipulare;
- aparatul nu este dotat cu un termometru propriu pentru monitorizarea temperaturii de includere;
- aparatul nu prezintă un înveliș exterior cu rezistență chimică crescută.

Aparatele și metodele cunoscute prezintă în general următoarele dezavantaje:

- lipsa portabilității și autonomia scăzută de utilizare;
- număr mai mare de piese în alcătuirea aparatului;
- necesitatea unui agent frigorific (ex. azot lichid) corelată cu necesitatea unei calificări suplimentare pentru manevrarea azotului lichid;
- înghețarea în două trepte (-20°C și apoi -80°C);
- absența monitorizării temperaturii pentru asigurarea condițiilor optime de înghețare;
- rezistență mecanică și chimică scăzută a învelișului exterior;
- imposibilitatea stocării blocului de gheață pentru procesare ulterioară

Problema tehnică a invenției constă în realizarea unui dispozitiv de crioincludere a materialului tisular de investigat care să fie portabil, ușor de manipulat, care să permită înghețarea țesutului la temperatura ultrascăzută (-80°C) fără pericolul formării artefactelor sau alterarea țesutului și care să fie utilizabil autonom, cu posibilitatea monitorizării temperaturii și cu rezistență mecanică și chimică sporită a învelișului exterior.

Dispozitiv pentru crioincludere a materialului tisular în vederea examinării microscopice conform invenției este alcătuit dintr-un ansamblu tip cuvă care împreună cu un ansamblu de tip capac de carcasă determină un spațiu interior pentru o camera de înghețare, izolată termic printr-un strat izolator. În ansamblul de tip cuvă se montează un bloc de metal cu conductivitate termică

și căldură specifică crescută, de regulă aluminiu, prevăzut pe o parte cu niște locașuri tronconice care au rolul cavităților formatoare pentru includerea țesuturilor în masa de gheață. Blocul de metal este înglobat într-un strat izolator de poliuretan de forma ansamblului tip cuvă, liber la partea superioară în dreptul locașurilor, iar la exterior stratul izolator de forma unei cuve este cuprins într-un înveliș de tip carcasă din material plastic care asigură structura suport și de rezistență a dispozitivului. Prin învelișul tip carcasa, pe lateral, este montat un termometru de contact care pătrunde cu o sondă de detecție sub formă de tijă în blocul de metal pentru monitorizarea temperaturii acestuia. La partea superioară a ansamblului de tip cuvă se dispune un ansamblu amovibil de tip capac de carcasă format dintr-un strat superior din material izolator de poliuretan și un înveliș exterior din material plastic ce realizează prin suprapunere peste stratul 4 și învelișul ansamblului tip cuvă un spațiu pentru o camera de înghețare deoarece marginile stratului și a învelișului depășesc înălțimea blocului de metal. Pe suprafața de închidere a celor două ansambluri se realizează pentru etanșare și poziționare fermă, o adâncitură de profil pătratic în stratul superior în care pătrunde o renură de profil pătratic și dimensiuni corespunzătoare unei asamblări cu joc de pe stratul izolator al cuvei asemănătoare montajului de tip mama-tată. Ansamblul amovibil de tip capac de carcasă este prevăzut cu niște dopuri în dreptul axei locașurilor de formare pentru includere a țesuturilor în masa de gheață dopuri ce susțin niște piese „port-obiect” pe care se crioinclude materialul tisular.

Metoda pentru crioinclude a materialului tisular în vederea examinării microscopice, conform invenției, se realizează prin următoarele etape succesive:

1. Dispozitivul constituit din ansamblul de tip cuva, fără ansamblul mobil de tip capac-carcasa se introduce și se menține în congelatorul de temperatura ultrajoasă până la obținerea temperaturii de -80°C a blocului de metal.
2. Capacul de carcasă prevăzut cu dopurile și piesele „port-obiect” se montează la deschiderea congelatorului și înainte de a scoate restul ansamblului din mediu de -80°C .
3. Se transporta dispozitivul cuva cu capac în condiții normale de temperatura la locul recoltării.
4. În momentul în care este necesară operațiunea de includere, se detașează ansamblul mobil de tip capac, se așează în cuva de includere în locașurile corespunzătoare fragmentul de țesut de interes, peste care se toarnă mediul de înghețare (OCT) astfel încât nivelul acestuia să depășească ușor planul superior al blocului de metal.
5. Se așează ansamblul mobil de tip capac peste carcasa dispozitivului cu piesele „port-obiect” deasupra, mediul de înghețare situat deasupra planului blocului intrând cu șanțurile piesei „port-obiect” și facilitând legarea eșantioanelor cu material tisular.
6. După înghețare, prin rotirea dopurilor, se obține detașarea blocului de gheață cu țesut tisular înglobat, format pe placa circulară a piesei „port-obiect”.
7. Piesa „port-obiect” cu șanțuri unidirecționale permite ca prin presarea blocului de gheață, cu material tisular, în direcția șanțurilor, să se obțină detașarea acestuia putând fi utilizat imediat sau stocat pentru utilizare ulterioară.

Dispozitivul pentru crioinclude a materialului tisular în vederea examinării microscopice, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

1. portabilitatea, care asigură disponibilitatea procesului de înghețare a țesutului la locul recoltării acestuia, minimizând timpul scurs între momentul obținerii fragmentului de țesut și crioincludea acestuia.

2. autonomia crescută de utilizare, prin scăderea transferului termic cu mediu ambiant datorită izolării camerei de înghețare,
3. număr scăzut de piese din care este constituit dispozitivul,
4. nu necesită agent frigorific suplimentar (ex. azot lichid, zăpadă carbonică).
5. dispozitivul poate fi folosit de oricine, fără a necesita o calificare și abilitare în utilizarea sa.
6. înghețarea se face rapid la temperatura ultrascăzută (-80°C),
7. controlul temperaturii prin prezența termometrului asigură condițiile optime de înghețare.
8. rezistență mecanică și chimică crescută a învelișului exterior (PVC),
9. oferă posibilitatea stocării blocului de gheață pentru procesare ulterioară, atât în camera de înghețare (temporar) cât și prin transfer ulterior în congelatoare de temperatura ultrajoasă.

Se da în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figurile care reprezintă:

- Fig. 1, ce reprezintă o secțiune longitudinală a dispozitivului;
- Fig. 2, ce reprezintă un port obiect ce permite detașarea blocului de gheață cu eșantionul de pe acesta.

Dispozitivul pentru crioincludere a materialului tisular în vederea examinării microscopice, conform invenției, este alcătuit dintr-un ansamblu de tip cuvă **A** care împreună cu un ansamblu de tip capac de carcasă **B** delimitează o cameră de înghețare în care se realizează și stochează eșantioane cu material tisular pentru investigații microscopice. În ansamblul de tip cuvă **A** se montează un bloc **1** solid de metal cu conductivitate termică și căldură specifică crescută, de regulă aluminiu (Fig. 1). Acesta este prevăzut cu mai multe locașuri **2** tronconice care au rolul cavităților formatoare pentru includerea țesuturilor în masă de gheață. Dimensiunile și numărul locașurilor **2** este variabil în funcție de necesitatea de investigație a diferitelor țesuturi și că atare vor determina dimensiunea minimă a blocului **1**. Grosimea blocului **1** este cea care determină în final autonomia dispozitivului deoarece cu cât blocul este mai gros, având o masă mai mare, inerția termică este mai mare iar încălzirea lui se va realiza într-un interval de timp mai mare.

Blocul **1** de metal este înglobat într-un strat **3** izolator de poliuretan de forma ansamblului tip cuvă **A**. Liber la partea superioară în dreptul locașurilor **2**. La exterior stratul izolator **3** de forma unei cuve este cuprins într-un înveliș **4** de tip carcasa din material plastic de regulă din PVC-policlorura de vinil- care asigură structura suport și de rezistență a dispozitivului. Prin învelișul **4** tip carcasa, pe lateral, este montat un termometru de contact **5** care pătrunde cu o sondă **6** de detecție sub formă de tijă în blocul **1** pentru monitorizarea temperaturii blocului **1** de metal. Afîșajul termometrului se află la exterior, pe laterală, aplicat peste învelișul **4** de tip carcasa extern.

La partea superioară a ansamblului de tip cuvă **A** format din blocul **1**, stratul izolator **3**, învelișul **4** și termometrul de contact **5**, se dispune un ansamblu amovibil de tip capac de carcasă **B** format dintr-un strat superior **7** din material izolator de poliuretan și un înveliș exterior din material plastic realizează prin suprapunere peste stratul **3** și învelișul **4** un spațiu pentru o camera **8** de înghețare deoarece marginile stratului **3** și a învelișului **4** depășesc înălțimea blocului **1**. Pe suprafața de închidere a celor două ansambluri se realizează, pentru etanșare și poziționare fermă, o adâncitură de profil pătratic în stratul superior **7** în care pătrunde o renură de profil pătratic și dimensiuni corespondente unei asamblări cu joc de pe stratul izolator **3** asemănătoare montajului de tip mama-tată.

În corpul stratului superior **7** sunt așezate, pe aceleași axe verticale cu cele ale locașurilor tronconice **2** din blocul **1** și corespondent cu numărul acestora, niște dopuri **9** tronconice de grosimea stratului superior **7** care la partea superioară sunt prevăzute cu niște proeminente **10** de formă cilindrică ce constituie zone de apucare pentru extragerea prin apucare - tragere a dopurilor **9** atunci când se dorește accesul operatorului pentru manipularea selectivă a unui eșantion de țesut înghețat în vederea sectionării unor lame pentru examinare microscopică.

În dopurile **9** cu orientare axial-centrală este inserată o piesă **11** "port obiect" având o tija inserată în dopul **9** și la partea opusă o platforma de tip placă circulară **12** (Fig.2) care la partea dinspre camera de înghețare, în zona cavității locașurilor **2** de formare prin crioincludere a eșantioanelor de țesut, are prevăzute niște striiațiuni **13** unidirecționale în formă de "V". Pe placa circulară **12**, în procesul de crioincludere, în limitele determinate de locașul **2** se formează prin înghețare un eșantion **14** care include țesutul de investigat. Striațiunile unidirecționale asigură rămânerea materialului tisular pe placă circulară **12**, atunci când la scoaterea eșantionului operatorul rotește tija **11** pentru desprinderea de locașul **2** formator a eșantionului crioinclus **14**. Prin aplicarea unei forțe în sensul striiațiunilor, prin alunecare, eșantionul **14** se va detașa de placa circulară **12** ceea ce va permite reutilizarea acesteia în cadrul aceleași sesiuni de includere.

Pentru creșterea autonomiei, respectiv pentru stocarea temporară a eșantioanelor **14** se poate folosi un congelator portabil de temperatura ultrajoasă. Camera de înghețare poate fi folosită pentru stocare temporară a blocurilor de gheață detașate până la mutarea lor în congelatoare dedicate. În situația în care numărul de blocuri formate în această etapă este mai mic decât numărul de cuve de includere, detașarea blocului de gheață de cuva de includere se va realiza doar în momentul mutării blocului în criotom pentru secționare sau în congelator de temperatură ultrajoasă pentru stocare.

Metoda pentru crioincludere a materialului tisular în vederea examinării microscopice, conform invenției, se realizează prin următoarele etape succesive:

1. Dispozitivul constituit din ansamblul de tip cuva având stratul **3**, învelișul **4** și blocul **1** cu termometrul de contact **5**, fără ansamblul mobil de tip capac, se introduce și se menține în congelatorul de temperatura ultrajoasă până la obținerea temperaturii de -80°C a blocului de metal.
2. Capacul de carcasă format din stratul superior **7** prevăzut cu dopurile **9** și piesele **11** „port-obiect” se montează la deschiderea congelatorului și înainte de a scoate restul ansamblului din mediu de -80°C .
3. Se transporta dispozitivul cuva cu capac în condiții normale de temperatura la locul recoltării.
4. În momentul în care este necesară operațiunea de includere, se detașează ansamblul mobil de tip capac, se așează în cuva de includere în locașurile **2** fragmentul de țesut de interes, peste care se toarnă mediul de înghețare ($^{\circ}\text{OCT}$) astfel încât nivelul acestuia să depășească ușor planul superior al blocului de metal.
5. Se așează ansamblul mobil de tip capac peste carcasa dispozitivului cu piesele **11** „port obiect” deasupra, mediul de înghețare situat deasupra planului blocului intrând în șanțurile piesei **11** „port obiect” și facilitând legarea eșantioanelor cu material tisular.
6. După înghețare, prin rotirea tijei piesei **11** „port-obiect” se obține detașarea blocului de gheață cu materialul tisular înglobat, format pe placa circulară **12**, de locașurile **2** de cuva de includere.
7. Piesa **11** „port obiect” cu șanțuri unidirecționale permite ca prin prin presarea blocului de gheață, cu material tisular, în direcția șanțurilor, să se obțină detașarea acestuia putând fi utilizat imediat sau stocat pentru utilizare ulterioară.

REVENDICĂRI

1. Dispozitiv pentru crioincludere a materialului tisular în vederea examinării microscopice alcătuit dintr-un ansamblu tip cuvă (A) care împreună cu un ansamblu de tip capac de carcasă (B) determina un spațiu interior pentru o camera de înghețare, izolată termic printr-un strat izolator (3) în ansamblul de tip cuvă (A) și un strat superior (7) în ansamblul de tip capac de carcasă (B) **caracterizat prin aceea că** în ansamblul de tip cuvă (A) se montează un bloc (1) de metal cu conductivitate termică și căldură specifică crescută, de regulă aluminiu prevăzut pe o parte cu niște locașuri (2) tronconice care au rolul cavităților formatoare pentru includerea țesuturilor în masa de gheață, blocul (1) de metal este înglobat într-un strat (3) izolator de poliuretan de forma ansamblului tip cuvă (A), liber la partea superioară în dreptul locașurilor (2), iar la exterior stratul izolator (3) de forma unei cuve este cuprins într-un înveliș (4) de tip carcasă din material plastic care asigură structura suport și de rezistență a dispozitivului, la partea superioară a ansamblului de tip cuvă (A) se dispune un ansamblu amovibil de tip capac de carcasă (B) format dintr-un strat superior (7) din material izolator de poliuretan și un înveliș exterior (8) din material plastic realizează prin suprapunere peste stratul (3) și învelișul (4) un spațiu pentru o camera de înghețare deoarece marginile stratului (3) și a învelișului (4) depășesc înălțimea blocului (1), pe suprafața de închidere a celor două ansambluri realizându-se, pentru etanșare și poziționare fermă, o adâncitură de profil pătratic în stratul superior (7) în care pătrunde o renură de profil pătratic și dimensiuni corespunzătoare unei asamblări cu joc de pe stratul izolator (3) asemănătoare montajului de tip mama-tată, ansamblu amovibil de tip capac de carcasă (B) fiind prevăzut cu niște dopuri (9) în dreptul axei locașurilor (2) de formare pentru includere a țesuturilor în masa de gheață.
2. Dispozitiv pentru crioincludere a materialului tisular în vederea examinării microscopice conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** în corpul stratului superior (7) sunt așezate, pe aceleași axe verticale cu cele ale locașurilor tronconice (2) din blocul (1) și corespunzător cu numărul acestora, niște dopuri (9) tronconice de grosimea stratului superior (7) care la partea superioară sunt prevăzute cu niște proeminente (10) de formă cilindrică ce constituie zone de apucare pentru extragerea prin apucare - tragere a dopurilor (9) atunci când se dorește accesul operatorului pentru manipularea selectivă a unui eșantion de țesut înghețat în vederea sectionării unor lame pentru examinare microscopică.
3. Dispozitiv pentru crioincludere a materialului tisular în vederea examinării microscopice conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** prin învelișul (4) tip carcasă, pe lateral, este montat un termometru de contact (5) care pătrunde cu o sondă (6) de detecție sub formă de tijă în blocul (1) pentru monitorizarea temperaturii blocului (1) de metal, afișajul termometrului fiind la exterior, pe laterală, aplicat peste învelișul (4) de tip carcasă extern.

4. Dispozitiv pentru crioincludere a materialului tisular în vederea examinării microscopice conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că în dopurile (9)** cu orientare axial-centrală este inserată o piesă (11) "port obiect" având o tija inserată în dopul (9) și la partea opusă o platforma de tip placă circulară (12) care la partea dinspre camera de înghețare, în zona cavității locașurilor (2) de formare prin crioincludere a eșantioanelor de țesut, are prevăzute niște striiațiuni (13) unidireționale în formă de "V", pe placa circulară (12), în procesul de crioincludere, în limitele determinate de locașul (2) se formează prin înghețare un eșantion (14) care include țesutul de investigat, striatiunile unidireționale asigurând rămânerea materialului tisular pe placa circulară (12), atunci când la scoaterea eșantionului operatorul rotește tija (11) pentru desprinderea de locașul (2) formator a eșantionului crioinclus (14) iar prin aplicarea unei forțe în sensul striatiunilor, prin alunecare, eșantionul (14) se va detașa de placa circulară (12) ceea ce va permite reutilizarea acesteia în cadrul aceleași sesiuni de includere.
5. Metodă pentru crioincludere a materialului tisular în vederea examinării microscopice, **caracterizată prin aceea** ca se realizează prin următoarele etape succesive:
- Dispozitivul constituit din ansamblul de tip cuva (A) având stratul (3), învelișul (4) și blocul (1) cu termometrul de contact (5) , fără ansamblul mobil de tip capac-carcasa (B), se introduce și se menține în congelatorul de temperatura ultrajoasă până la obținerea temperaturii de -80°C a blocului de metal.
 - Capacul de carcasă format din stratul superior (7) prevăzut cu dopurile (9) și piesele (11) „port-obiect” se montează la deschiderea congelatorului și înainte de a scoate restul ansamblului din mediu de -80°C.
 - Se transporta dispozitivul cuva cu capac în condiții normale de temperatura la locul recoltării.
 - În momentul în care este necesară operațiunea de includere, se detașează ansamblul mobil de tip capac, se așează în cuva de includere în locașurile (2) fragmentul de țesut de interes, peste care se toarnă mediul de înghețare (OCT) astfel încât nivelul acestuia să depășească ușor planul superior al blocului de metal.
 - Se așează ansamblul mobil de tip capac peste carcasa dispozitivului cu piesele (11) „port obiect” deasupra, mediul de înghețare situat deasupra planului blocului intrând în șanțurile piesei (11) „port obiect” și facilitând legarea eșantioanelor cu material tisular.
 - După înghețare, prin rotirea tijei piesei (11) „port obiect”, se obține detașarea blocului de gheață cu material tisular înglobat , format pe placa circulară (12), de locașurile (2) de cuva de includere.
 - Piesa (11) „port obiect” cu șanțuri unidireționale permite ca prin prin presarea blocului de gheață, cu țesut tisular, în direcția șanțurilor, să se obțină detașarea acestuia putând fi utilizat imediat sau stocat pentru utilizare ulterioară.

