

(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00600**

(22) Data de depozit: **30/09/2021**

(41) Data publicării cererii:
28/01/2022 BOPI nr. 1/2022

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ A BANATULUI
"REGELE MIHAI I AL ROMÂNIEI" - DIN
TIMIȘOARA, CALEA ARADULUI NR. 119,
TIMIȘOARA, TM, RO;
• SPITALUL CLINIC JUDEȚEAN DE
URGENTĂ PIUS BRINZEU TIMIȘOARA -
CENTRUL ONCOGEN,
BD.LIVIU REBREANU, NR.156,
TIMIȘOARA, TM, RO

(72) Inventatori:
• GAVRILIUC OANA-ISABELLA,
STR.MARTIR IOAN MERIUȚAC, BL.B27,
SC.A, AP.3, TIMIȘOARA, TM, RO;

• BOJIN MARIA FLORINA,
BD.16 DECEMBRIE 1989, NR.61, AP.11,
TIMIȘOARA, TM, RO;
• HRÎTCU ELENA- MIHAELA,
STR.ECOULUI, NR.9, TIMIȘOARA, TM, RO;
• TUDOR BEATRICE ANA-MARIA,
STR.CONSTANTIN STERE, NR.3, SC.A,
ET.4, AP.17, TIMIȘOARA, TM, RO;
• MIRCUCĂ CALIN, STR.PRAGA, NR.37,
DUMBRĂVIȚA, TM, RO;
• HUȚU IOAN, STR.GH.LAZĂR, NR.34,
ET.VIII, AP.69, TIMIȘOARA, TM, RO

(74) Mandatar:
CABINET DE PROPRIETATE INDUSTRIALĂ
TUDOR ICLĂNZAN,
PIAȚA VICTORIEI NR.5, SC.D, AP.2,
TIMIȘOARA, TM

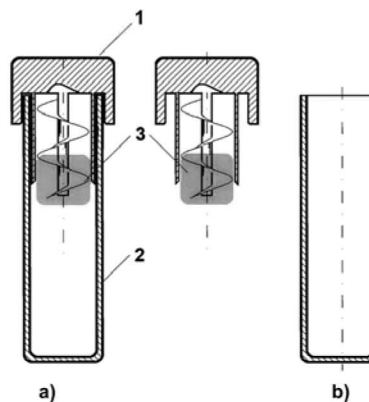
(54) INSTRUMENT ȘI METODĂ PENTRU IZOLAREA CELULELOR SOMATICE DIN LAPTE PRIN CENTRIFUGARE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un instrument și la o metodă pentru izolarea celulelor somatice din lapte prin centrifugare, utilizate în pregătirea probelor de lapte pentru analize de citometrie în flux. Instalația conform invenției este constituită dintr-o piesă (1) cilindrică cavă de tip pahar realizată din materiale plastice sterilizabile prin autoclavare, în care central și axial, la partea inferioară deschisă, este prelungită cu o tijă elicoidală de tip tirbușon care pătrunde în cavitatea cilindrică a unei eprubete (2), pe capătul căreia se assemblează prin alunecare și presare piesa (1) astfel încât, în procesul de centrifugare a laptelui, pe tija elicoidală a piesei (1) se aglomerează și se atașează lipidele din laptele centrifugat, formând un dop (3) cilindric din lipide care se detașează după scoaterea piesei (1) din eprubeta (2) și rotirea piesei (1) cu dopul (3) cilindric imobilizat. Metoda conform invenției constă în colectarea laptelui în tuburi sterile de poli-propilenă cu diametrul de 15...50 ml păstrate maximum 4 ore de la colectare la o temperatură de 2...8°C, pentru fiecare probă pregătindu-se câte un flacon steril de 50 ml pe care se așează câte un filtru steril de 40 μm, se filtrează 10 ml de lapte/probă și se diluează cu 10 ml PBS steril rece, se centrifughează timp de 20 minute la 4°C, 500 x G, se îndepărtează lipidele cu ajutorul instrumentului și se aspiră supernatantul, se resuspendă sedimentul celular în 1 ml PBS rece și se transferă într-un tub de 5 ml, se adaugă 2 ml PBS rece și se centrifughează 500 x G, timp de 10 minute la o

temperatură de 4°C, se îndepărtează supernatantul, se resuspendă sedimentul celular în 1 ml PBS rece numărându-se celulele cu un hemocitometru, se adaugă 1 ml PBS rece și se centrifughează la 500 xG timp de 10 minute la 4°C, se îndepărtează supernatantul, se resuspendă sedimentul în PBS la o concentrație de 10⁶ celule/ml și se păstrează la 2...8°C până la marcarea în vederea efectuării citometriei în flux.

Revendicări: 4
Figuri: 1



Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



INSTRUMENT ȘI METODĂ PENTRU IZOLAREA CELULELOR SOMATICE DIN LAPTE PRIN CENTRIFUGARE

Invenția se referă la o metodă și un instrument cu utilitate în pregătirea probelor de lapte pentru analize de citometrie în flux a populațiilor de celule somatice. Domeniul general este cel al flow-citometriei laptelui în medicina umană și veterinară.

Citometria în flux reprezintă o metodă de elecție pentru cuantificarea și caracterizarea celulelor somatice din probele de lapte obținute de la diverse specii de mamifere (animale și om) datorită acurateței și reproductibilității rezultatelor obținute. Prin marcarea cu anticorpi specifici conjugați cu fluorocromi pot fi identificate diferitele populații de celule somatice cu implicație în imunitate, monitorizate în lapte (macrofage, neutrofile, limfocite), a căror prezență este corelată cu starea de sănătate a animalului și cu indicii de calitate ai laptelui.

În mod natural, laptele conține o serie de componente de natură biochimică (apă, lactoză, proteine, minerale, grăsimi), dintre care în special componenta lipidică poate interfera cu analiza diferențială a celulelor somatice.

În vederea obținerii unei suspensii unicelulare de celule somatice din lapte care să poată fi marcată cu anticorpi și analizată prin metoda de citometrie în flux, probele de lapte trebuie procesate prin pași repețiți de centrifugare și spălare cu o soluție de tampon fosfat, urmărind îndepărtarea în totalitate a conținutului lipidic care, după centrifugare, formează un strat care „plutește” deasupra probei de lapte.

Este cunoscută invenția CN112746055A care dezvăluie un proces de optimizare a separării celulelor somatice din lapte și care se referă la domeniul tehnic al extracției ARN-ului cu celule somatice din lapte. Procesul de optimizare a separării celulelor somatice din lapte cuprinde o etapă de

precipitare a separării celulelor somatice din lapte și o etapă de extracție a ARN, în care procesul de precipitare a separării celulelor somatice din lapte are în componență următoarele etape: colectarea unei probe de lapte proaspăt folosind tuburi de centrifugă de 15 ml; umplerea cu lapte a patru sau mai multe tuburi de centrifugă de 15 ml și centrifugare la 1800 rotații/minut timp de 10 minute la temperatura camerei; aruncarea zerului și a grăsimilor din lapte. Procesul de extracție a ARN-ului cuprinde următorii pași: adoptarea unui kit AM1561; transferarea lizatului din tuburile de centrifugă de 15 ml într-un tub de centrifugă de 1,5 ml. Conform procesului de optimizare a procesului de separare a celulelor somatice din lapte dezvoltat prin invenție, celulele somatice din lapte sunt separate pe loc, fără filtrare sau adăugare de reactivi suplimentari, astfel încât timpul este foarte mult economisit, operațiile inutile sunt reduse și simplificate, iar procesul de precipitare a separării celulelor somatice din lapte este mai rapid, mai simplu și mai convenabil.

Se cunoaște invenția US20150253302A1, o metodă și un aparat pentru decelarea încărcăturii celulare în lapte. Metoda pentru decelarea celulelor de alte particule, precum și a diferitelor tipuri de celule din probele de lapte crud se realizează prin citometrie cu microfluență de impedanță și permite analiza calității laptelui crud în ceea ce privește conținutul său de celule bacteriene și somatice fără a fi necesară tratarea prealabilă a probei de lapte, astfel încât analiza să poată avea loc direct la locul de producție. Metoda permite separarea (în principal de particulele lipidice) și numărarea celulelor somatice din particulele de lapte prin analiza impedanței de înaltă frecvență efectuată direct pe laptele crud netratat, fapt care permite depistarea mastitei în conformitate cu analiza numărului de celule somatice și în timp real, imediat după ce laptele crud a trecut de microcanalul dispozitivului microfluidic.

Metodele și dispozitivele cunoscute nu asigură separarea rapidă, simplă și eficientă a lipidelor de suspensia de celule somatice sau solicită relocarea unui echipament scump la nivelul fermei.



Z

Problema tehnică a invenției este de a realiza un instrument simplu și integrabil tubului din centrifugă și o metodă prin care celule somatice să fie ușor și rapid separabile din lapte (suspensie de proteine, minerale și grăsimi) și din stratul de lipide care se formează prin centrifugarea probelor de lapte folosite în analizele citometrice.

Instrumentul și metoda pentru izolarea celulelor somatice din lapte prin centrifugare conform invenției este constituit dintr-o piesă cilindrică cavă, de tip pahar, în care central și axial partea inferioară deschisă este prelungită cu o tijă elicoidală de tip tirbușon, ce pătrunde în cavitatea cilindrică a unei eprubete de tip Falcon. Pe capătul eprubetei se assemblează prin alunecare și presare piesa cilindrică cavă, astfel ca, într-un proces de centrifugare a laptelui, pe tija elicoidală a piesei să se aglomereze și să se atașeze lipidele din laptele centrifugat, formând un dop cilindric din lipide. Acesta se detașează după scoaterea piesei din eprubetă și rotirea piesei cu dopul cilindric imobilizat.

Invenția prezintă următoarele **avantaje**:

- se utilizează un instrument de eliminare a lipidelor de construcție simplă
- se simplifică detașarea lipidelor de stratul celulelor somatice
- manevrarea este rapidă și eficace

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figura care reprezintă:

Fig.1 Secțiune longitudinală în poziție asamblată la formarea dopului de lipide (a) și în poziție dezamblată, după formarea dopului de lipide și înainte de eliminarea lui (b).

Z

Metoda pentru izolarea celulelor somatice din lapte prin centrifugare conform invenției:

1. Laptele se colectează în recipiente sterile (tuburi de 15÷50 ml de polipropilenă) și se procesează în termen de patru ore de la colectare. Se păstrează la o temperatură de 2-8°C, în intervalul de la colectare la procesare.
2. Pentru fiecare probă se pregătește câte un tub Falcon steril de 50 ml, pe care se așează câte un filtru steril de 40 μm. Se filtrează 10 ml de lapte per probă și se diluează cu 10 ml PBS steril rece.
3. Se centrifughează timp de 20 min, la temperatura de 4°C, 500 x G. Se îndepărtează grăsimea cu ajutorul **dispozitivului** descris în prezenta invenție și se aspiră cu grijă supernatantul. Se resuspendă sedimentul celular în 1ml PBS rece și se transferă într-un tub de 5 ml.
4. Se adaugă 2 ml PBS rece și se centrifughează 500 x G, timp de 10 minute, la temperatura de 4°C. Se îndepărtează supernatantul prin aspirare sau decantare.
5. Se adaugă 2 ml PBS rece și se centrifughează 500xG, timp de 10 minute, la temperatura de 4°C. Se îndepărtează supernatantul.
6. Se resuspendă sedimentul celular în 1 ml PBS rece și se numără celulele cu ajutorul hemocitometrului. Se adaugă 1 ml PBS rece și se centrifughează la 500 x G, timp de 10 minute, la temperatura de 4°C. Se îndepărtează supernatantul.
7. Se resuspendă sedimentul celular în PBS la o concentrație de 10^6 celule/ml, conform numărării anterioare.
8. Se păstrează la 2-8°C până la marcarea în vederea efectuării citometriei în flux.

5

Instrumentul, conform invenției, este realizat ca o piesă 1 de tip capac de tub Falcon, eprubetă 2 (Fig.1), tub utilizat la centrifugare, capacul prezentând o prelungire spre interiorul tubului Falcon sub forma unui tub în care se află o tijă elicoidală asemănătoare unui tirbușon. În timpul centrifugării, lipidele se aglomerează spre capac și tija elicoidală a acestuia, astfel încât, la terminarea centrifugării, pe pereții capacului și pe tija elicoidală a piesei 1 s-a atașat un dop 3 compact de lipide. Detașarea piesei 1 de eprubetă 2 prin extragere permite desprinderea dopului de lipide 3 ca urmare a rotirii piesei 1. Forma elicoidală a tijei piesei 1 care pătrunde în eprubeta 2 are rolul de a fixa axial dopul 3 de lipide și de a permite separarea prin extragere de soluția rămasă în eprubeta 2. Piesa 1 realizează la asamblare cu eprubeta 2 un joc alunecător pe suprafețele cilindrice de contact.

Insertul și capacul pot fi realizate dintr-un material plastic (polipropilenă etc.) sterilizabil prin autoclavare.

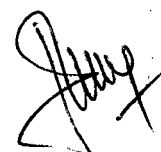


REVENDICĂRI

1. Instrument pentru izolarea celulelor somatice din lapte prin centrifugare, destinat pregătirii probelor pentru analize citometrice, **caracterizat prin aceea că** este constituit dintr-o piesă (1) cilindrică cavă, de tip pahar, în care central și axial, la partea inferioară deschisă, este prelungită cu o tijă elicoidală de tip tirbușon ce pătrunde în cavitatea cilindrică a unei eprubete (2) de tip Falcon pe capătul căreia se assemblează prin alunecare și presare piesa (1) astfel că într-un proces de centrifugare a laptelui pe tija elicoidală a piesei (1) se aglomerează și se atașează lipidele din laptele centrifugat, formând un dop cilindric (3) din lipide care se detașează după scoaterea piesei (1) din eprubetă (2) și rotirea piesei (1) cu dopul cilindric (3) imobilizat.
2. Instrument pentru izolarea celulelor somatice din lapte prin centrifugare destinat pregătirii probelor pentru analize citometrice conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** piesa (1) este realizată din materiale plastice sterilizabile prin autoclavare.
3. Instrument pentru izolarea celulelor somatice din lapte prin centrifugare destinat pregătirii probelor pentru analize citometrice conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** asamblarea piesei (1) cu eprubeta (2) în timpul centrifugării este realizată cu joc alunecător între diametrul exterior al eprubetei (2) și diametrul interior al cavității cilindrice din piesa (1).
4. Metoda pentru izolarea celulelor somatice din lapte prin centrifugare destinat pregătirii probelor pentru analize citometrice, **caracterizată prin aceea că** se realizează în următoarele etape:



- Se colectează laptele în recipiente sterile (tuburi de 15÷50 ml de polipropilenă) și se păstrează la o temperatură de 2-8°C, maximum patru ore de la colectare.
- Pentru fiecare probă se pregătește câte un tub Falcon steril de 50 ml, pe care se așează câte un filtru steril de 40 μm.
- Se filtrează 10 ml de lapte per probă și se diluează cu 10 ml PBS steril rece.
- Se centrifughează timp de 20 minute, la temperatură de 4°C, 500 x G și se îndepărtează lipidele cu ajutorul instrumentului **conform revendicării 1** și se aspiră cu grijă supernatantul.
- Se resuspendă sedimentul celular în 1mL PBS rece și se transferă într-un tub de 5 ml.
- Se adaugă 2 ml PBS rece și se centrifughează 500 x G, timp de 10 minute, la o temperatură de 4°C.
- Se îndepărtează supernatantul prin aspirare sau decantare.
- Se adaugă 2ml PBS rece și se centrifughează 500xG, 10 minute, la o temperatură de 4°C.
- Se îndepărtează supernatantul.
- Se resuspendă sedimentul celular în 1 ml PBS rece și se numără celulele cu ajutorul hemocitometrului.
- Se adaugă 1 ml PBS rece și se centrifughează la 500 x G, timp de 10 minute, la o temperatură de 4°C.
- Se îndepărtează supernatantul.
- Se resuspendă sedimentul celular în PBS la o concentrație de 10⁶ celule/ml, conform numărării anterioare.
- Se păstrează la 2-8°C până la marcarea în vederea efectuării citometriei în flux.



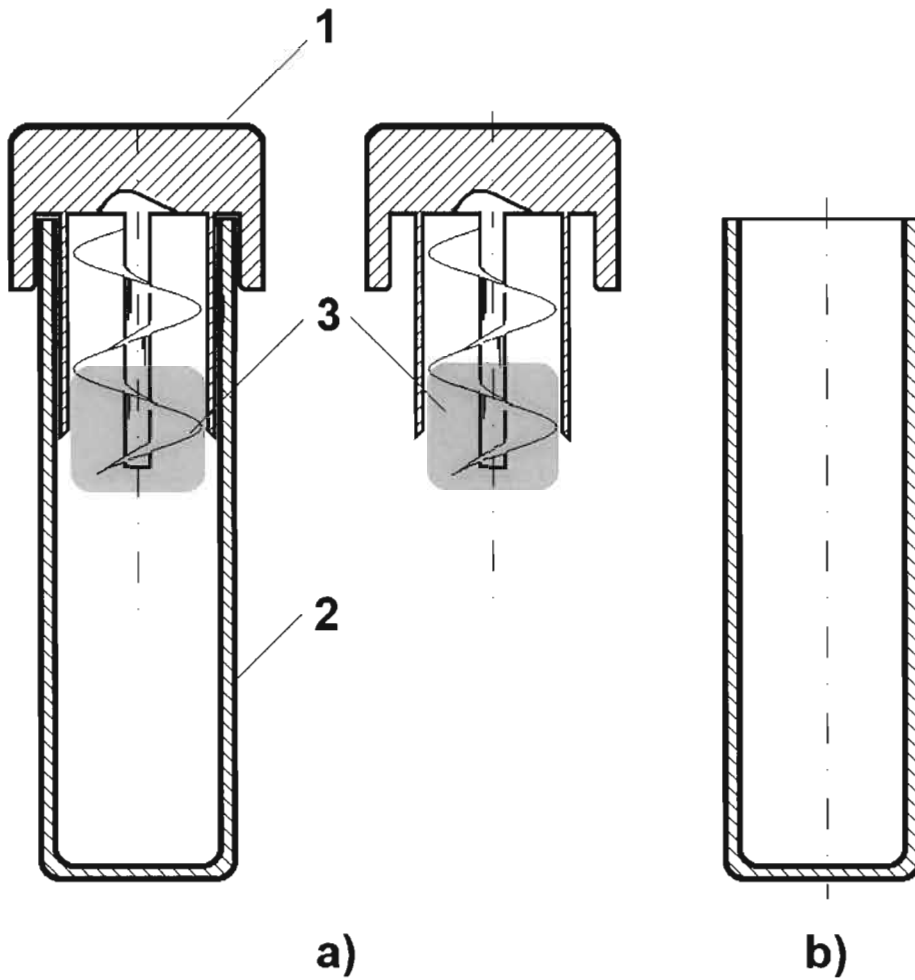


Fig.1. Secțiune longitudinală în poziție asamblată la formarea dopului de lipide (a) și în poziție dezasamblată după formarea dopului de lipide și înainte de eliminarea lui (b).

Handwritten signature