

PROTOCOLO DE CULTIVO DE MUESTRAS DE VELLOSIDADES CORIALES (CVS)¹

- a) Transfiera el espécimen desde el tubo de transporte a una placa Petri de 60 mm de diámetro que contenga 5 ml de RPMI 1640
- b) Lave la vellosidad con medio fresco para retirar las células sanguíneas.
- c) Utilice el microscopio invertido para diseccionar y retirar cuidadosamente los coágulos o decidua que puedan quedar en la vellosidad coriónica.
- d) Lave cuidadosamente la vellosidad en una solución de solución salina de Hank's sin Ca^{++} y Mg^{++}

Cultivos a largo plazo

- a) Transfiera la vellosidad a un tubo de centrifugación esteril que contenga 2 ml de Pronasa E (Meerk, 4.000.000 PU/g)* e incube de 4 a 6 minutos a temperatura ambiente, agitando suavemente de vez en cuando.
- b) Añada de 3 a 5 ml de HBSS (sin Ca^{++} y Mg^{++}) frío para parar la acción de la enzima.
- c) Centrifugue durante 5 minutos a 1500 rpm y elimine el sobrenadante.
- d) Añada 2 ml de Colagenasa tipo II (Sigma, 1 mg/ml) esteril e incube a 37°C durante 10 minutos.
- e) Añada de 3 a 5 ml de HBSS frío para parar la acción enzimática.
- f) Centrifugue durante 5 minutos a 1500 rpm y elimine el sobrenadante.
- g) Añada 2 ml de **Amniomed® Plus** y resuspenda las partículas.
- h) Prepare de 2 a 6 placas Petri (Amniodish) dependiendo del volumen de partículas de células. Añada 2 ml del medio con **Amniomed® Plus** a cada placa y distribúyalo bien en cada suspensión de células.
- i) Incube a 37°C y 5% de CO₂ en el incubador.
- j) Al cabo de 4 días de cultivo, revise la evolución del crecimiento del cultivo mediante la utilización de un microscopio invertido.
- k) Cuando las áreas de crecimiento muestren células en mitosis, vierta una gota de Colcemid a cada placa Petri (a una concentración final de 0.05 µg/ml) y mantenga en el incubador durante 4-6 horas más.

Preparación cromosómica

Siga los mismos pasos descritos para la preparación cromosómica de cultivo celular de líquido amniótico.

*Disuelva 25 mg de Pronasa E en 25 ml de HBSS sin Ca^{++} y Mg^{++} . Filtre con una membrana de 0.2 µm. Separe alícuotas y conserve en alta congelación ($\leq -18^{\circ}C$).

¹ Este protocolo es una mera traducción del manual de uso de Amniomed plus propiedad de Euroclone SPA y por tanto deberá ser siempre referido a el a todos los efectos.