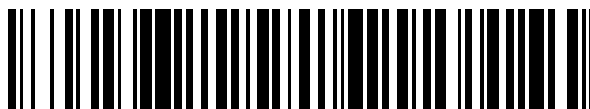


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 296**

51 Int. Cl.:

G01N 35/10 (2006.01)

G01N 15/06 (2006.01)

G01N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2014** **PCT/EP2014/067116**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015** **WO15018933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2014** **E 14749836 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019** **EP 3030909**

54 Título: **Procedimiento de preparación de un recipiente celular que consta de los medios de pre-análisis de una muestra tomada**

30 Prioridad:

09.08.2013 FR 1357924

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

15.10.2019

73 Titular/es:

NOVACYT (100.0%)
13 avenue Morane Saulnier
78140 Velizy Villacoublay, FR

72 Inventor/es:

PELTIER, ERIC

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 727 296 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

Procedimiento de preparación de un recipiente celular que consta de los medios de pre-análisis de una muestra tomada

5

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación para el análisis de una suspensión celular tal y como se define en las reivindicaciones.

[0002] El procedimiento está por ejemplo destinado a preparar una lámina de análisis celular en el contexto de un reconocimiento o diagnóstico médico a partir de muestras citológicas, tales como frotis de cuello de útero u otras.

[0003] Las células recogidas se depositan en un frasco de muestras donde las células se hallan en solución. Se toma después una parte de la solución celular y se deposita en un recipiente de análisis para un análisis diagnóstico de la muestra. El documento WO-2011/117523 describe por ejemplo tal arreglo de preparación.

15

[0004] Sin embargo, el recipiente de análisis obtenido no siempre permite obtener un diagnóstico pertinente y seguro, por ejemplo porque la muestra tomada no contiene suficientes células o porque las células interesantes para un diagnóstico no se encuentran en esta muestra. El recipiente de análisis obtenido entonces es inutilizable.

[0005] En algunas aplicaciones como el frotis de reconocimiento del cáncer de cuello de útero, se realizan extensiones celulares sobre láminas de análisis y cada elemento debe contener un número de células que satisfaga la clasificación de Bethesda, que es una clasificación para estandarizar el resultado diagnóstico de los frotis. Así, cada extensión debe comprender más de 5000 células.

[0006] En el documento FR-2 922 019, se divulga un procedimiento de medición de la densidad celular que se realiza en la cámara de decantación situada por encima de la lámina de análisis. La densidad medida, por ejemplo por difracción de la luz, se compara a continuación respecto a una densidad umbral correspondiente a la densidad celular mínima de extensión sobre la lámina de análisis necesaria para realizar un diagnóstico pertinente. Así, si la densidad medida es inferior a la densidad umbral, el procedimiento consta de una etapa adicional de ajuste de la densidad celular de extensión mediante el añadido en la cámara de decantación de una cantidad más importante de suspensión celular tomada en el frasco que la cantidad para realizar una segunda lámina de extensión representativa.

[0007] Sin embargo, este tipo de muestra en la cámara de decantación presenta el inconveniente de realizarse después de un primer depósito de células. Efectivamente, en caso de insuficiencia de células en la lámina de análisis, es necesario extraer de nuevo de la suspensión celular para realizar una segunda extensión. Así pues, se trata de realizar una etapa adicional completa de depósito de células sobre lámina. Otros ejemplos de documentos del estado de la técnica son: US2012/0142043, US2010/0163111, EP2535712, US2007/0041875 o US2010/0221772.

[0008] Uno de los objetivos de la invención es el de paliar estos inconvenientes ofreciendo un procedimiento de preparación que permita ajustar la densidad celular y reducir el tiempo de preparación de recipientes de análisis para una sola etapa estandarizada, garantizando una calidad de estos contenidos que permita la obtención de un diagnóstico fiable.

[0009] A este efecto, la invención tiene como objeto el procedimiento de análisis o de control pre-analítico de preparación de una suspensión celular del tipo citado, en el que entre la etapa de extracción y la etapa de depósito, el procedimiento comprende al menos una etapa de pre-análisis de la muestra tomada, siendo dicha etapa realizada por un dispositivo de pre-análisis dispuesto sobre la tubería del dispositivo de pipeteo y distribución.

[0010] Este procedimiento permite garantizar la calidad de los recipientes dando la información pre-analítica de la suspensión celular de la toma hecha por el práctico, es decir en el frasco. Analizando la muestra tomada, por ejemplo para determinar si contiene suficientes células, antes de realizar el recipiente de análisis, se garantiza que la muestra utilizada para realizar este recipiente es muy pertinente. Este pre-análisis se realiza en el dispositivo de pipeteo y distribución, lo que evita realizar una segunda extensión de análisis si el pre-análisis no es satisfactorio. Se evita la realización de una segunda lámina mediante el dispositivo de pipeteo y distribución y se garantiza la realización de recipientes de análisis aptos para ser analizados posteriormente de manera fiable en una etapa pre-analítica y no post-analítica.

[0011] Según otros aspectos de la invención, el sistema comporta una o varias de las características siguientes, tomada(s) aisladamente o según todas las combinaciones técnicamente posibles:

60

-la etapa de medición de la densidad celular comprende además una etapa de comparación de la densidad celular medida en una densidad de referencia;

-si la densidad celular medida es inferior, respectivamente superior, a la densidad de referencia, la etapa comprende además al menos las etapas siguientes:

65

(f) extracción de un volumen de la suspensión celular superior a un volumen estándar, respectivamente inferior al volumen estándar, por medio del dispositivo de pipeteo y distribución para obtener extensiones de densidad homogénea;

5 (g) establecimiento de una información relativa al volumen extraído para asegurar una trazabilidad de las etapas de tratamiento de la muestra,

10 realizándose dichas etapas hasta que se alcance un umbral del número de células extraídas que garanticen la pertinencia del análisis;

-la densidad celular se mide emitiendo luz en la tubería a través de la muestra y midiendo la atenuación o la difracción de la luz que ha atravesado la muestra; y

15 el dispositivo de pipeteo y distribución comprende al menos una aguja adaptada para tomar una muestra de la suspensión, extendiéndose la tubería entre la aguja y los medios de aspiración y expulsión, estando la etapa de extracción dispuesta para que al menos una parte de la muestra tomada pase a la tubería junto al dispositivo de pre-análisis.

20 **[0012]** La invención se comprenderá mejor a la luz de la siguiente descripción facilitada a modo de ejemplo y realizada haciendo referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- la figura 1 es una vista en corte esquemático de una máquina de extracción y análisis que comprende un aparato de preparación para el análisis y

25 - la figura 2 es una vista en corte de un frasco durante una etapa de extracción del procedimiento de preparación en al análisis de una suspensión celular según la invención.

30 **[0013]** En la descripción, los términos «arriba» y «abajo» se definen con relación a la relación de circulación de un líquido detergente en la aguja, siendo el líquido expulsado en la aguja por medios de expulsión dispuestos en la parte superior de la aguja. Como consecuencia, la dispensa de la aguja se hace según una dirección de arriba a abajo, mientras que la aspiración se hace según una dirección de abajo a arriba.

35 **[0014]** En la fig. 1, se ha representado un autómata 1 de preparación y de análisis de al menos un frasco 4 que contiene una suspensión celular 5 para analizar (Fig. 2), tal como por ejemplo una suspensión citológica fijada. Las suspensiones celulares 5 se obtienen mediante una puesta en suspensión de tomas celulares obtenidas por ejemplo durante una operación de reconocimiento mediante frotis de cuello de útero o mediante otros tipos de muestras. La forma en que la muestra se pone en suspensión y en que las células se preservan es conocida y no se describirá aquí con detalle.

40 **[0015]** La máquina 1 comprende para lo esencial una bandeja de recepción 6 de los frascos 4 y de cámaras de decantación 10 dispuestas por encima de láminas de análisis en las que las extensiones celulares en capa delgada deben realizarse a partir de las suspensiones celulares 5, mediante un dispositivo de pipeteo y distribución 12, apto para extraer muestras de suspensiones celulares 5 y para depositar estas muestras en las cámaras de decantación 10, pasando eventualmente por etapas de tratamiento intermedias.

50 **[0016]** En la medida en que el autómata 1 y su funcionamiento se han descrito en el documento WO-2011/117523, el autómata no será descrito con más detalle aquí. El experto en la materia puede referirse a este documento para conocer todas demás características, detalles y variantes de realización. Se entiende que la máquina se puede adaptar para realizar otros tipos de recipientes de análisis aparte de láminas de análisis. Por ejemplo, los recipientes de análisis 22 de este sistema 20 de preparación y de análisis pueden constar, según el modo de análisis elegido por el práctico, de láminas de extensión, de tubos de extracción o de fragmentación y pozos de análisis o de decantación.

55 **[0017]** El dispositivo de pipeteo y distribución 12, o incluso dispositivo de extracción, se extiende por encima de la bandeja de recepción 6 y es apto para extraer, desplazar y verter o evacuar diversos productos líquidos, sobre todo muestras de suspensiones celulares 5. Para hacer esto, el dispositivo de pipeteo y distribución 12 comprende una pluralidad de agujas 14, o pipetas, tubulares y huecas, desplazables entre los diferentes puestos de la máquina 1 mediante un brazo 16 y móvil verticalmente para permitir bajar y levantar las agujas 14.

60 **[0018]** Cada aguja 14 se extiende entre un extremo superior 18 y uno inferior 20 en comunicación fluidica el uno con el otro.

[0019] Las operaciones de extracción de muestras de una suspensión celular 5 se hacen mediante aspiración por el extremo inferior 20 de la aguja 14 y las operaciones de vertido o evacuación se hacen mediante aspiración o

dispensa, por este extremo inferior 20. Para ello, el extremo superior 18 de la aguja se comunica flúidicamente con medios de aspiración y de expulsión 22 dispuestos en la parte superior de la aguja 14 y ordenados para aspirar productos y expulsarlos mediante el extremo inferior 20 de la aguja. Para ello. Los medios de aspiración y de expulsión 22 están unidos al extremo superior 18 de la aguja 14 mediante una tubería 24, por ejemplo una tubería ligera para desplazar la aguja 14 respecto a los medios de aspiración y de expulsión 22, como se representa en la fig. 2.

[0020] Los medios de aspiración y de expulsión 22 son por ejemplo formados por una bomba de aspiración-expulsión clásica para este tipo de aplicación. Alternativamente, los medios de aspiración y de expulsión 22 podrían estar formados por un sistema de pistón y/o de válvulas, u otro. Los medios de aspiración y de expulsión 22 permiten poner en marcha las etapas que implican el dispositivo de pipeteo y distribución 12 en el funcionamiento del robot 1. Un captador de nivel 25 está previsto a la altura de la tubería 24 entre el extremo superior de la aguja 14 y los medios de aspiración y expulsión 22 para determinar la presencia o no de productos en la tubería 24.

[0021] El dispositivo de pipeteo y distribución 12 incluye igualmente medios de pre-análisis 26 de la muestra tomada por la aguja 14. Estos medios de pre-análisis 26 están previstos en la tubería 24, es decir en la parte superior de la aguja 14 y en la parte inferior de los medios de aspiración y de expulsión 22, por ejemplo cerca del extremo superior 18 de la aguja 14.

[0022] Estos medios de pre-análisis se adaptan para permitir un pre-análisis de una muestra tomada inmediatamente de la suspensión celular 5, como se representa en la fig. 2, o inmediatamente después de una etapa de tratamiento de la muestra, tal como una etapa de marcaje celular. Por marcaje celular se entiende la introducción de un marcaje particular en la muestra o en la suspensión celular o una etapa de coloración de la muestra o de la suspensión celular. Este pre-análisis consiste en una medida de la densidad celular de la muestra.

[0023] Los medios de pre-análisis 26 comprenden al menos medios de emisión 28 de una señal F, medios de recepción 30 de la señal F que han atravesado la tubería 24 y medios de análisis 32 de la señal recibida por los medios de recepción 30. Los medios de emisión 28 y los medios de recepción 30 están dispuestos a una y otra parte de la tubería 24 de manera que una señal emitida por los medios de emisión 28 sea recibida del otro lado de la tubería 24 por los medios de recepción 30 después de que la señal F ha atravesado la tubería 24 y su contenido.

[0024] Como ejemplo, los medios de emisión 28 y de recepción 30 podrían preverse en un conector 34 dispuesto para fijar juntos la aguja 14 y la tubería 24 o prepararse en una manga que envuelva la tubería 24.

[0025] Para la medida de una densidad celular, los medios de emisión 28 son por ejemplo una fuente de luz, tal como uno o varios diodos electroluminiscentes, láser (láser sintonizable, fuente de luz policromática, etc.), dispuesta para emitir una señal luminosa, tal como un fotodiodo (APD, regleta CCD, cámara CCD CMOS o espectómetro), que haya atravesado la tubería.

[0026] Los medios de análisis 32 son entonces por ejemplo, medios de medida de la absorción de la señal luminosa recibida por los medios de recepción 30 o medios de medida de la difracción de la luz mediante células presentes en la muestra pre-analizada. Tales métodos de medida de la densidad celular, mediante medición de la absorción de la luz o de la difracción, son conocidos y no se detallarán más aquí.

[0027] La etapa de pre-análisis se realiza de la siguiente manera: la muestra tomada es aspirada en la tubería al menos hasta que pase junto a los medios de pre-análisis 26, lo que puede estar determinado gracias al captador de nivel 24. Los medios de pre-análisis se activan entonces y la señal recibida, modificada respecto a la señal emitida por su paso a través de la muestra, es transmitida a los medios de análisis 32, que determina la densidad celular de la muestra.

[0028] En el caso de la medida de la densidad celular en la muestra, los medios de análisis 32 comparan la densidad medida con una densidad llamada de referencia. La densidad de referencia es la densidad celular necesaria para obtener una densidad celular y un número de células pertinentes en el recipiente de análisis 22 para poder realizar un diagnóstico.

[0029] Si, en un primer caso, la densidad celular medida es superior a la densidad de referencia, la aguja 14 extrae del frasco una cantidad de suspensión celular inferior a la cantidad estándar, normalmente tomada cuando la densidad celular corresponde a la densidad de referencia. Después, la aguja 14 se desplaza, a través del brazo robotizado 16, por encima de un recipiente de análisis 10 o de otras partes de la máquina si se prevén las etapas de tratamiento de la muestra. La muestra contenida en la tubería 24 se vierte en el recipiente de análisis 10 donde se trata, por ejemplo, en un pozo o tubo de recepción para técnica o análisis complementario u otros.

[0030] Si, en un primer caso, la densidad celular medida es inferior a la densidad de referencia, la aguja 14 extrae del frasco una cantidad de suspensión celular superior a la cantidad estándar de manera que aumente el número de células extraídas y llegue a un umbral que garantice la pertinencia del análisis.

[0031] El aparato y el proceso de preparación para el análisis de suspensión celular descritos antes, permiten obtener directamente en los recipientes de análisis unas muestras celulares optimizadas para realizar un análisis pertinente que lleve a una interpretación del reconocimiento o del diagnóstico. La muestra se analiza inmediatamente antes de su extracción o antes de su tratamiento, lo que evita así la realización de una segunda extensión.

5

[0032] La determinación de la densidad celular permite una caracterización pre-analítica de la suspensión celular y el establecimiento de una información sobre la cantidad de la suspensión extraída para asegurar una trazabilidad de las etapas de tratamiento de la muestra, para informar a la persona o los medios encargados del análisis acerca de la representatividad de la muestra inicial.

10

[0033] Los medios de pre-análisis 26 pueden utilizarse igualmente para asegurar una verificación del correcto funcionamiento de la máquina 1. En efecto, si la máquina está dispuesta para realizar un tratamiento de la suspensión celular, por ejemplo una coloración o un marcaje, es posible determinar si este tratamiento ha sido correctamente realizado haciendo pasar una muestra salida de la suspensión tratada mediante los medios de pre-análisis 26 y así verificar que las características de la muestra obtenida a partir del tratamiento corresponden a las características esperadas como consecuencia de la operación de tratamiento. Los medios de pre-análisis permiten por tanto un seguimiento cualitativo de la máquina.

15

[0034] Además, el aparato se puede adaptar a una pluralidad de agujas, de manera que se puedan realizar simultáneamente varios pre-análisis, y por tanto en particular automatizar la preparación y el análisis de una pluralidad de suspensiones.

20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación para el análisis de una suspensión celular (5) que comprende al menos las etapas sucesivas siguientes:
- 5 (a) extracción de una muestra de la suspensión celular (5) por medio de un dispositivo de pipeteo y distribución (12), comprendiendo dicho dispositivo de pipeteo y distribución (12) al menos una tubería (24);
- (b) depósito de la muestra presente en el dispositivo de pipeteo y distribución (12) en un recipiente de análisis (10);
- 10 Dicho procedimiento entre la etapa de extracción y la etapa de depósito, comprende al menos una etapa de pre-análisis de la muestra extraída, siendo dicha etapa realizada por un dispositivo de pre-análisis (26) dispuesto en la tubería (24) del dispositivo de pipeteo y distribución (12), **caracterizado porque** dicha etapa de pre-análisis es una etapa de medición de la densidad celular de la muestra extraída.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la etapa de medición de la densidad celular comprende además una etapa de comparación de la densidad celular medida en una densidad de referencia;
3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado porque**, si la densidad celular medida es
- 20 inferior, respectivamente superior, a la densidad de referencia, la etapa comprende además al menos las etapas siguientes:
- (f) extracción de un volumen de la suspensión celular superior a un volumen estándar, respectivamente inferior al volumen estándar, por medio del dispositivo de pipeteo y distribución para obtener extensiones de densidad
- 25 homogénea;
- (g) establecimiento de una información relativa al volumen extraído para asegurar una trazabilidad de las etapas de tratamiento de la muestra,
- 30 realizándose dichas etapas hasta que se alcance un umbral del número de células extraídas que garanticen la pertinencia del análisis;
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, **caracterizado porque** la densidad celular se mide emitiendo luz en la tubería a través de la muestra y midiendo la atenuación o la difracción de la luz que
- 35 ha atravesado la muestra.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, **caracterizado por que** el dispositivo de pipeteo y distribución 12 comprende al menos una aguja (14) adaptada para extraer una muestra de la suspensión, extendiéndose la tubería (24) entre la aguja 14 y los medios de aspiración y expulsión (22), estando dispuesta la etapa
- 40 (a) de extracción para que al menos una parte de la muestra extraída pase a la tubería (24) junto al dispositivo de pre-análisis (26).

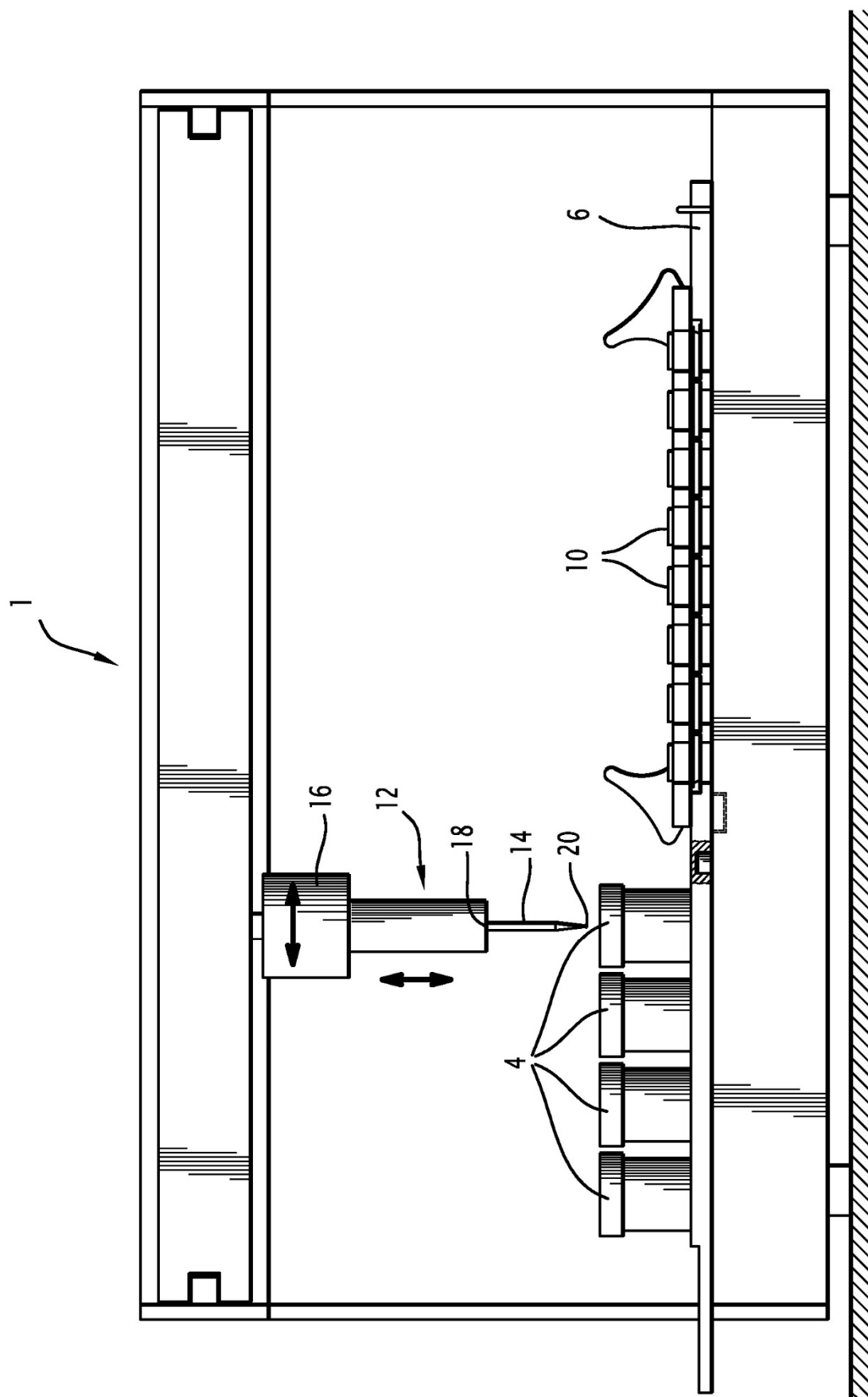


FIG.1

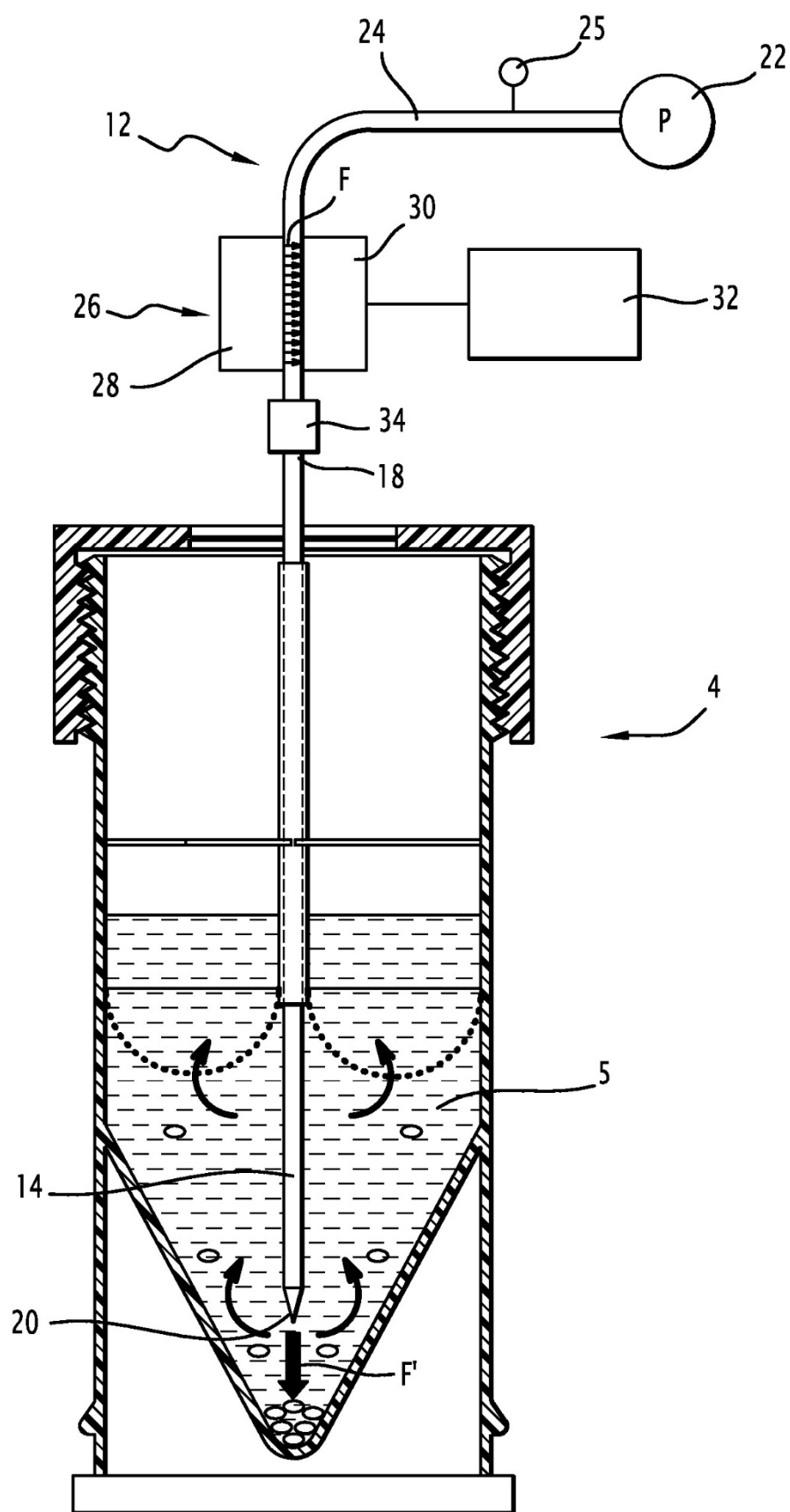


FIG.2