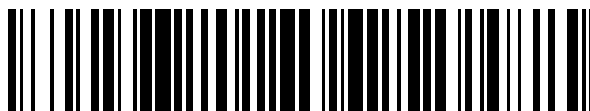


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 564**

51 Int. Cl.:

G01N 1/31 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14159473 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2784474**

54 Título: **Método de análisis de células**

30 Prioridad:

29.03.2013 JP 2013071041

22.01.2014 JP 2014009537

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

15.11.2016

73 Titular/es:

**SYSMEX CORPORATION (100.0%)
5-1, Wakinohama-Kaigandori 1-chome, Chuo-ku,
Kobe-shi,
Hyogo 651-0073, JP**

72 Inventor/es:

**MORITA, MASAKATSU;
OGURO, MASAHIKO;
YOKOYAMA, KOJI y
YAMAMOTO, YUKA**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 589 564 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 de análisis de células

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de análisis de células empleado para analizar células recogidas de organismos vivos.

10 Antecedentes

Convencionalmente, se ha conocido un analizador de células configurado para analizar automáticamente el contenido de ADN de células y proporcionar información de cancerización de las células basándose en el contenido de ADN analizado.

15 Por ejemplo, el documento US2009/091746 da a conocer un analizador de células, en el que las células recogidas de un sujeto de prueba se someten a tratamientos, tales como tinción PI, para preparar una muestra de medición, la muestra de medición preparada se hace fluir al interior de una célula de flujo y se irradia luz en la muestra de medición que fluye en la célula de flujo para obtener señales de luz fluorescente y señales de luz dispersada de las células respectivas, y se analizan formas de onda de las señales obtenidas para extraer parámetros característicos que reflejan de las mismas información tal como contenido de ADN, tamaño de núcleo y tamaño celular. El analizador de células determina entonces si las células son cancerosas o displásicas basándose en los parámetros característicos.

25 Se da a conocer en el documento WO2012/039097 que un recipiente de biomuestra que contiene un medio que contiene alcohol en el que se conservan las células se coloca en un analizador de células, el medio en el recipiente de muestra se sustituye por un diluyente y se somete a tratamientos, tales como tinción PI, en el analizador de células para preparar una muestra de medición que va a hacerse fluir en una célula de flujo.

30 Derradji H. *et al.* Anticancer Research 25: 1039-1050 (2005) titulado "*Comparison of Different Protocols for Telomere Length Estimation by Combination of Quantitative Fluorescence In situ Hybridization (Q-FISH) and Flow Cytometry in Human Cancer Cell Lines*" da a conocer un método para analizar una célula, que comprende regular una temperatura de un medio, en el que se conserva la célula y obtener información óptica irradiando luz sobre la célula. Las células se hacen crecer en medio RPMI a 37°C y entonces se fijan en un medio que comprende alcohol a temperatura ambiente.

35

Sumario de la invención

40 El alcance de la presente invención se define solamente por las reivindicaciones adjuntas, y no se ve afectado en modo alguno por las declaraciones dentro de este sumario.

45 Según la divulgación del documento WO2012/039097, las células que van a analizarse se conservan en el medio que contiene alcohol. Sin embargo, cuando las células se conservan así en el medio, tal como se da a conocer en el documento, la temperatura de conservación del medio que contiene las células difiere de un hospital o una instalación de prueba a otro. En algunos casos, los medios se conservan a temperatura ambiente, o en otros casos, se conservan en una nevera. Cuando el medio que contiene las células se transporta desde un hospital a una instalación de prueba o similar, es posible que la temperatura de conservación cambie en función de los ambientes en los se transporta el medio. Por tanto, la temperatura de conservación del medio es variable según diferentes condiciones de conservación y transporte.

50 Los inventores de la presente invención usaron un medio en el que las células se conservan en un analizador de células, tal como se da a conocer en el documento WO2012/039097 para analizar las células. Los inventores descubrieron de este análisis que había variabilidad en la información óptica medida (información de luces fluorescente y dispersada) debido a diferentes temperaturas de conservación del medio.

55 La presente invención se llevó a cabo para resolver los problemas de estas técnicas relacionadas. Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de análisis de células que puede controlar tal variabilidad información óptica debida a diferentes temperaturas de conservación de un medio en el que se conservan las células.

60 A raíz de los continuos estudios e investigaciones sobre la relación entre la temperatura de conservación del medio en el que se conservan las células y la información óptica obtenida por el analizador de células, los inventores de la presente invención encontraron la manera de controlar tal variabilidad de la información óptica obtenida de las células conservadas en el medio alimentado al analizador de células; la variabilidad puede controlarse cuando la temperatura del medio que contiene las células y alimentado al analizador de células se regula de 35°C a 45°C.

65 Basándose en este hallazgo, los inventores finalmente llevaron a cabo la presente invención.

5 Un método para analizar una célula según la presente invención comprende: regular una temperatura de un medio que comprende alcohol, en el que la célula se fija por el medio; teñir ADN de la célula fijada por alcohol con una solución de tinción fluorescente que contiene un colorante; hacer fluir la célula al interior de un citómetro de flujo; y obtener una información de luz fluorescente irradiando luz de una fuente luminosa del citómetro de flujo sobre la célula, en el que el método se caracteriza porque la temperatura del medio se regula de 35°C a 45°C.

10 El método de análisis de células proporcionado por la presente invención incluye la etapa de regular la temperatura del medio de 35°C a 45°C. Según esta etapa, la variabilidad de la información óptica obtenida en la etapa de medición puede controlarse de manera adecuada independientemente de la temperatura de conservación del medio. Por tanto, cualquier proceso realizado tras la misma basado en la información óptica puede obtener resultados precisos sin verse afectado por la temperatura de conservación del medio.

15 Un ejemplo de un analizador de células que no forma parte de la presente invención comprende: una unidad de regulación de temperatura configurada para regular una temperatura de un medio a un grado predeterminado, en el que la célula se conserva en el medio; un dispositivo de preparación de muestra de medición configurado para preparar una muestra de medición sustituyendo el medio por un diluyente; y un dispositivo de medición configurado para obtener información óptica irradiando luz sobre la célula incluida en la muestra de medición.

20 Este ejemplo de analizador de células incluye la unidad de regulación de temperatura configurada para regular la temperatura del medio a un grado predeterminado. Según esta configuración, la variabilidad de la información óptica obtenida por el dispositivo de medición puede controlarse de manera adecuada independientemente de la temperatura de conservación del medio alimentado al analizador de células. Por tanto, cualquier proceso realizado tras la misma basándose en la información óptica puede obtener resultados precisos sin verse afectado por la temperatura de conservación del medio.

25 La presente invención logra controlar la variabilidad de información óptica debida a la diferencia de temperaturas de conservación de un medio en el que se conservan células.

30 **Breve descripción de los dibujos**

- La figura 1 es una vista en perspectiva de una estructura global de un analizador de células según un ejemplo;
- la figura 2 muestra esquemáticamente la configuración interna de un dispositivo de medición proporcionado en el analizador de células;
- 35 la figura 3 muestra la configuración de un citómetro de flujo;
- la figura 4 es un diagrama de flujo que muestra las etapas de una operación realizada por el analizador de células;
- 40 la figura 5A es un diagrama de una señal de luz dispersada hacia delante (FSC) y una señal de luz fluorescente lateral (SFL) obtenidas en una operación de medición; la figura 5B es una vista ampliada esquemática en sección transversal de células epiteliales en cuello uterino; la figura 5C es un gráfico que muestra una relación entre una relación N/C y tamaño celular;
- 45 la figura 6A es un diagrama que muestra una relación entre contenido de ADN y recuento celular en un ciclo celular; la figura 6B es un diagrama de contenido de ADN que cambia por ciclo celular;
- la figura 7 es un diagrama de dispersión que muestra una relación entre una relación N/C y anchura celular (tamaño celular);
- 50 la figura 8 es un histograma que muestra una relación entre contenido de ADN y recuento celular;
- la figura 9 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba 1-1 en células epiteliales en cuello uterino;
- 55 la figura 10 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba 1-2 en células epiteliales en cuello uterino;
- la figura 11 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba 1-3 en células epiteliales en cuello uterino;
- la figura 12 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba 1-4 en células epiteliales en cuello uterino;
- 60 la figura 13 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba 1-5 en células epiteliales en cuello uterino;
- la figura 14 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba 1-6 en células epiteliales en cuello uterino;
- 65 la figura 15 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba 1-7 en células epiteliales en cuello uterino;

la figura 16 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba 2 en células epiteliales en cuello uterino;

la figura 17 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba 3-1 en células epiteliales en mucosa oral;

5 la figura 18 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba 3-2 en células epiteliales en mucosa oral; y

la figura 19 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba 3-3 en células epiteliales en mucosa oral.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

10 Las realizaciones preferidas de la presente invención se describirán a continuación en el presente documento con referencia a los dibujos.

15 La figura 1 es una vista en perspectiva de una estructura global de un analizador de células.

Un analizador 1 de células según el presente ejemplo se caracteriza porque una muestra de medición que contiene células (biomuestra) recogida de un paciente (sujeto de prueba) se hace fluir al interior de una célula de flujo, se irradia luz láser sobre la muestra de medición que fluye en la célula de flujo para detectar luces de la muestra de medición (luz dispersada hacia adelante, luz dispersada lateral, luz fluorescente lateral), y se analizan señales ópticas de estas luces para determinar si las células sometidas a prueba incluyen células cancerosas o células que crecen convirtiéndose en células cancerosas (a continuación en el presente documento, denominadas de manera colectiva "células cancerosas"). Más específicamente, el analizador 1 de células se usa para la detección de cáncer de cuello uterino, en el que se usan células epiteliales de cuello uterino recogidas de pacientes.

25 Tal como se muestra en la figura 1, el analizador 1 de células tiene un dispositivo 2 de medición y un dispositivo 3 de tratamiento de datos. El dispositivo 2 de medición realiza operaciones tales como una operación de medición de una biomuestra recogida de un paciente. El dispositivo 3 de tratamiento de datos, conectado al dispositivo 2 de medición, realiza operaciones tales como análisis y visualización (salida) de un resultado obtenido de la operación de medición. Una unidad 2a de colocación de analito se instala en el lado frontal del dispositivo 2 de medición. En la
30 unidad 2a de colocación de analito se sitúan una pluralidad de recipientes 4 de muestra (véase la figura 2), conteniendo cada uno en su interior un medio que consiste principalmente en metanol en el que se conserva la biomuestra (células) recogidas de un paciente. El dispositivo 3 de tratamiento de datos tiene una unidad 31 de entrada, una unidad 32 de visualización y un controlador 33.

35 [Configuración de dispositivo 2 de medición]

La figura 2 muestra esquemáticamente la configuración interior del dispositivo de medición proporcionado en el analizador de células.

40 Tal como se muestra en la figura 2, la unidad 2a de colocación de analito transporta bastidores 4a que sujetan una pluralidad de recipientes 4 de muestra uno tras uno hasta una posición en la que se aspira la muestra mediante una unidad 11 de pipeta de analito.

45 La unidad 11 de pipeta de analito transfiere la muestra en el recipiente 4 de muestra a una unidad 10 de regulación de temperatura. La unidad 11 de pipeta de analito transfiere la muestra en la unidad 10 de regulación de temperatura a una primera unidad 12 de dispersión. La unidad 11 de pipeta de analito transfiere la muestra en la primera unidad 12 de dispersión a una unidad 13 de subdetección y una unidad 14 de discriminación y sustitución. La unidad 11 de pipeta de analito alimenta un recipiente 5 de muestra de medición con una disolución concentrada obtenida en la unidad 14 de discriminación y sustitución. La unidad 11 de pipeta de analito puede moverse a
50 posiciones en la dirección superior de la unidad 10 de regulación de temperatura, una parte 12a del recipiente de muestra de la primera unidad 12 de dispersión, una parte 13a de recogida de muestra de la unidad 13 de subdetección, la unidad 14 de discriminación y sustitución, y el recipiente 5 de muestra de medición situado en una parte 11b de entrega y recepción de muestra.

55 La unidad 11 de pipeta de analito tiene una pipeta 11a que aspira y descarga la muestra, y está configurada para cuantificar la muestra usando un cuantificador de muestra no mostrado en el dibujo (tal como un cilindro de cuantificación, un motor que acciona un pistón en el cilindro de cuantificación). La unidad 11 de pipeta de analito está además configurada para alimentar una cantidad predeterminada de muestra a las unidades y partes.

60 La unidad 10 de regulación de temperatura regula la temperatura del medio transportado desde el recipiente 4 de muestra de la unidad 2a de colocación de analito a un grado predeterminado. Específicamente, la unidad 10 de regulación de temperatura tiene una parte 10a de colocación de muestra en la que se coloca el recipiente de muestra cuya temperatura va a regularse. La unidad 10 de regulación de temperatura está configurada para calentar el recipiente de muestra en la parte 10a de colocación de muestra y regular así la temperatura del medio en el
65 recipiente de muestra.

La primera unidad 12 de dispersión realiza un primer tratamiento de dispersión para dispersar células agregadas incluidas en la muestra. Específicamente, el primer tratamiento de dispersión es un tratamiento de aplicación de una fuerza de cizalla en el que se aplica una fuerza de cizalla a las células agregadas para dispersarlas. La primera unidad 12 de dispersión incluye una parte 12a de recipiente de muestra que puede contener la muestra en su interior, y está configurada para aplicar mecánicamente la fuerza de cizalla a las células agregadas en la muestra alimentada a la parte 12a de recipiente de muestra.

La unidad 13 de subdetección mide la concentración de la muestra antes de que comience la operación de medición realizada por una unidad 22 de detección principal. La unidad 13 de subdetección tiene un citómetro 40 de flujo (véase la figura 3A) casi idéntico a un citómetro de flujo previsto en la unidad 22 de detección principal que se describirá a continuación.

La unidad 14 de discriminación y sustitución recibe la muestra tras realizarse el primer tratamiento de dispersión a la misma mediante la primera unidad 12 de dispersión, y sustituye (diluye) el medio de la muestra que consiste principalmente en metanol con un diluyente. Específicamente, el medio de la muestra que consiste principalmente en metanol se filtra a una medida predeterminada mediante un filtro que permite el paso de fluidos pero no de células, y se añade una disolución tampón al medio filtrado. Esto reduce cualquier impacto en la tinción de ADN descrita a continuación que puede provocarse por el metanol en el medio. Como resultado, el ADN de cualquier célula que va a medirse puede teñirse de manera favorable. Además, la unidad 14 de discriminación y sustitución discrimina las células que van a medirse incluidas en la muestra (células epiteliales en cuello uterino recogidas de un sujeto de prueba) de cualquier otra célula (por ejemplo, glóbulos rojos, glóbulos blancos, bacterias) e impurezas. Además, la unidad 14 de discriminación y sustitución concentra las células que van a medirse incluidas en la muestra para obtener un recuento celular requerido en la operación de medición realizada por la unidad 22 de detección principal. Para aumentar la eficacia del funcionamiento se proporcionan dos unidades 14 de discriminación y sustitución.

Una unidad 15 de transporte de recipiente sujeta el recipiente 5 de muestra de medición colocado en una unidad 18 de reacción usando una parte 15a de sujeción que tiene una forma similar a tijeras, y transporta el recipiente 5 de muestra de medición sujeta por la misma a la parte 11b de entrega y recepción de muestra, una segunda unidad 16 de dispersión, una unidad 17 de eliminación de líquido, y entonces a la unidad 18 de reacción. La unidad 15 de transporte de recipiente está configurada para mover la parte 15a de sujeción a lo largo de una trayectoria circunferencial predeterminada. La unidad 15 de transporte de recipiente también está configurada para poder mover la parte 15a de sujeción hacia arriba y hacia abajo. La parte 11b de entrega y recepción de muestra, la segunda unidad 16 de dispersión, la unidad 17 de eliminación de líquido, y la unidad 18 de reacción se sitúan en la trayectoria circunferencial. Por tanto, el recipiente 5 de muestra de medición colocado en la unidad 18 de reacción, cuando se sujeta por la parte 15a de sujeción de la unidad 15 de transporte de recipiente, puede transportarse a las partes y unidades situadas en la trayectoria circunferencial.

La segunda unidad 16 de dispersión realiza un segundo tratamiento de dispersión que difiere del primer tratamiento de dispersión a la muestra tras realizarse el primer tratamiento de dispersión a la misma mediante la primera unidad 12 de dispersión. Específicamente, después de que se someta la muestra al primer tratamiento de dispersión realizado por la primera unidad 12 de dispersión y entonces se concentre en la unidad 14 de discriminación y sustitución (en la que se enriquecen las células que van a medirse), la segunda unidad 16 de dispersión imparte vibración supersónica a la muestra resultante. La segunda unidad 16 de dispersión dispersa las células agregadas que permanecen tras el primer tratamiento de dispersión en células únicas.

Tras realizarse el segundo tratamiento de dispersión mediante la segunda unidad 16 de dispersión, la unidad 17 de eliminación de líquido elimina líquido de la superficie externa del recipiente 5 de muestra de medición (drenaje). El segundo tratamiento de dispersión se realiza al recipiente 5 de muestra de medición mojado en líquido. Por tanto, la unidad 17 de eliminación de líquido envía un flujo de aire a la superficie exterior del recipiente 5 de muestra de medición para eliminar cualquier gota de líquido que permanezca en la superficie exterior del mismo. Esto evita la transferencia del líquido a otros componentes estructurales, tales como la unidad 18 de reacción cuando se coloca en la misma el recipiente 5 de muestra de medición.

La unidad 18 de reacción acelera las reacciones entre la muestra en el recipiente 5 de muestra de medición y los reactivos añadidos a la muestra mediante una primera unidad 19 de adición de reactivo y una segunda unidad 20 de adición de reactivo. La unidad 18 de reacción tiene una mesa 18a rotativa circular que puede rotarse mediante una unidad de accionamiento no mostrada en el dibujo. Una pluralidad de partes 18b de retención formadas para retener los recipientes 5 de muestra de medición en su interior se proporciona en una parte periférica exterior de la mesa 18a rotativa. El recipiente 5 de muestra de medición se coloca en la parte 18b de retención. La trayectoria de la parte 18b de retención accionada por la rotación de la mesa 18a rotativa y la trayectoria circunferencial de la parte 15a de sujeción de la unidad 15 de transporte de recipiente se cruzan entre sí en una posición predeterminada. La unidad 15 de transporte de recipiente está configurada para colocar el recipiente 5 de muestra de medición en la parte 18b de retención en la posición de cruce. La unidad 18 de reacción calienta el recipiente 5 de muestra de medición colocado en la parte 18b de retención a una temperatura predeterminada (aproximadamente 37°C) y acelera de este modo las reacciones entre la muestra y los reactivos.

La primera unidad 19 de adición de reactivo y la segunda unidad 20 de adición de reactivo respectivamente alimentan los reactivos al interior del recipiente 5 de muestra de medición colocado en la parte 18b de retención. La primera unidad 19 de adición de reactivo y la segunda unidad 20 de adición de reactivo se sitúan en posiciones en la proximidad de la parte periférica exterior de la mesa 18a rotativa, y respectivamente tienen alimentadores 19a y 20a que pueden moverse a posiciones P1 y P2 en la dirección superior del recipiente 5 de muestra de medición colocado sobre la mesa 18a rotativa. Cuando el recipiente 5 de muestra de medición se transporta mediante la mesa 18a rotativa a, y llega, a la posición P1, P2, puede alimentarse una cantidad predeterminada de reactivo desde el alimentador 19a, 20a al interior del recipiente 5 de muestra de medición.

El reactivo añadido por la primera unidad 19 de adición de reactivo es RNasa usada para el aislamiento de ARN de las células. El reactivo añadido por la segunda unidad 20 de adición de reactivo es una solución de tinción usada para la tinción de ADN de las células. El aislamiento de ARN descompone el ARN en una célula para que pueda medirse solamente el ADN del núcleo celular. La tinción de ADN usa una disolución de yoduro de propidio (PI) que es una disolución de tinción fluorescente que contiene colorantes. La tinción de ADN tiñe de manera selectiva el núcleo celular, permitiendo la detección de fluorescencia del núcleo celular. En el presente documento, el "dispositivo de preparación de muestra de medición" según el ejemplo incluye todos los componentes estructurales en los que la muestra se prepara a partir de la biomuestra que se sitúan entre la unidad 10 de regulación de temperatura y la unidad 22 de detección principal. La "unidad de preparación de muestra de medición" según la presente realización incluye las unidades 12 y 16 de dispersión, la unidad 14 de discriminación y sustitución, la unidad 18 de reacción, y las unidades 19 y 20 de adición de reactivo.

Una unidad 21 de aspiración de muestra aspira la muestra (muestra de medición) en el recipiente 5 de muestra de medición colocado en la parte 18b de retención, y transfiere la muestra de medición aspirada a la unidad 22 de detección principal. La unidad 21 de aspiración de muestra se sitúa en una posición en la proximidad de la parte periférica exterior de la mesa 18a rotativa, y tiene una pipeta 21a que puede moverse a una posición P3 en la dirección superior del recipiente 5 de muestra de medición colocado sobre la mesa 18a rotativa. Cuando el recipiente 5 de muestra de medición se transporta mediante la mesa 18a rotativa y llega a la posición P3, la unidad 21 de aspiración de muestra puede aspirar la muestra de medición en el recipiente 5 de muestra de medición. La unidad 21 de aspiración de muestra se conecta a una célula 43 de flujo de la unidad 22 de detección principal (véase la figura 3A) a través de un recorrido de flujo no mostrado en el dibujo para poder alimentar la muestra de medición aspirado por la pipeta 21a al interior de la célula 43 de flujo de la unidad 22 de detección principal.

La unidad 22 de detección principal tiene el citómetro 40 de flujo que está configurado para detectar luces de la muestra de medición (luz dispersada hacia adelante, luz dispersada lateral, luz fluorescente lateral), y da como salida señales basándose en estas luces (señales ópticas) a un circuito proporcionado en una etapa posterior. El citómetro 40 de flujo se describirá a continuación con referencia a las figuras 3A y 3B.

Una unidad 23 de limpieza de recipiente limpia el interior del recipiente 5 de muestra de medición después de alimentar la muestra de medición a la unidad 22 de detección principal mediante la unidad 21 de aspiración de muestra. La unidad 23 de limpieza de recipiente está configurada para descargar una disolución de limpieza al interior del recipiente 5 de muestra de medición retenido en la parte 18b de retención de la mesa 18a rotativa y limpiar así el interior del recipiente 5 de muestra de medición. Cuando el mismo recipiente 5 de muestra de medición se usa de nuevo más tarde para medir una muestra diferente, el tratamiento de limpieza evita la contaminación de la muestra con cualquier otra muestra que permanezca en el recipiente 5 de muestra de medición.

La figura 3A muestra la configuración del citómetro 40 de flujo de la unidad 22 de detección principal. Tal como se muestra en la figura 3, se condensa luz láser emitida desde un láser 41 semiconductor sobre la muestra de medición que fluye en la célula 43 de flujo mediante un sistema 42 de lentes que incluye una pluralidad de lentes. La muestra aspirada por la pipeta 21a de la unidad 21 de aspiración de muestra se alimenta al interior de la célula 43 de flujo.

Tal como se muestra en la figura 3B, el sistema 42 de lentes incluye una lente 42a colimador, un sistema de lentes cilíndricas (combinación de una lente 42b convexa plana y una lente 42c biconvexa), un sistema de lentes condensadoras (combinación de una lente 42d condensadora y una lente 42e condensadora). Estas lentes se disponen en el mencionado orden desde el lado de láser 41 semiconductor (desde el lado izquierdo mostrado en las figuras 3A y 3B).

Una lente 44 de condensación condensa las luces dispersadas hacia delante desde las células de la muestra de medición sobre un detector de luz dispersada que incluye un fotodiodo 45. Una lente 46 de condensación para luces laterales, condensa la luz dispersada lateral y la luz fluorescente lateral desde las células que van a medirse y los núcleos de estas células y guía las luces condensadas a un espejo 47 dicróico. El espejo 47 dicróico hace que la luz dispersada lateral se refleje en un fotomultiplicador (multiplicador de fotoelectrones) 48 y transmite la luz fluorescente lateral a través del mismo hacia un fotomultiplicador (multiplicador de fotoelectrones) 49. Por tanto, la luz dispersada lateral se condensa en el fotomultiplicador 48, mientras que la luz fluorescente lateral se condensa en el fotomultiplicador 49. En estas luces se reflejan las características de las células y núcleos de las células en la muestra de medición.

El fotodiodo 45 y los fotomultiplicadores 48 y 49, respectivamente, convierten las señales ópticas recibidas en señales eléctricas y entonces dan como salida una señal de luz dispersada hacia adelante (FSC), una señal de luz dispersada lateral (SSC) y una señal de luz fluorescente lateral (SFL). Las señales así dadas como salida se amplifican mediante un amplificador no mostrado en el dibujo y entonces se dan como salida a un controlador 24 (véase la figura 2) del dispositivo 2 de medición. El controlador 24 tiene las funciones de, por ejemplo; procesar las señales ópticas dadas como salida desde el fotodiodo 45 y los multiplicadores 48 y 49, controlar las operaciones de la unidad 22 de detección principal y la unidad 13 de subdetección, controlar las operaciones de los componentes estructurales 2a, 10 a 12, 14 a 21, y 23 en los se se prepara la muestra, y transmitir y recibir varias informaciones hasta y desde el dispositivo 3 de tratamiento de datos.

El controlador 24 tiene una unidad de computación tal como un microprocesador, y un almacenamiento que incluye, por ejemplo, ROM y RAM. En el almacenamiento, se almacenan varios programas de control y datos para controlar las operaciones de las unidades 22 y 13 de detección y los componentes estructurales 2a, 10 a 12, 14 a 21, y 23 en los que se prepara la muestra. Las señales FSC, SSC y SFL procesadas por el controlador 24 del dispositivo 2 de medición se transmiten al dispositivo 3 de tratamiento de datos mediante una unidad de comunicación.

Tal como se describe, la unidad 22 de detección principal tiene un citómetro 40 de flujo mostrado en la figura 3A, y da como salida la señal de luz dispersada hacia adelante (FSC), la señal de luz dispersada lateral (SSC) y la señal de luz fluorescente lateral (SFL) obtenida de la muestra de medición. El controlador 24 ejecuta los procesos de señal necesarios en las señales dadas como salida de la unidad 22 de detección principal.

La unidad 13 de subdetección tiene un citómetro 40 de flujo casi idéntico a un citómetro de flujo proporcionado en la unidad 22 de detección principal, cuya descripción, por tanto, se omite. La unidad 13 de subdetección mide la concentración de la muestra antes de que comience la operación de medición realizada por la unidad 22 de detección principal. Según el ejemplo, la unidad 13 de subdetección está configurada para obtener la señal de luz dispersada hacia adelante (FSC), y da como salida una señal para contar las células que corresponden a los tamaños de células epiteliales basándose en las señales de luz dispersada hacia adelante obtenidas. La señal de luz dispersada hacia adelante FSC dada como salida de la unidad 13 de subdetección se introduce en y se procesa por el controlador 24.

[Configuración del dispositivo de tratamiento de datos]

Tal como se muestra en la figura 1, el dispositivo 3 de tratamiento de datos incluye un ordenador personal, por ejemplo, un PC portátil o un PC de sobremesa, y tiene una unidad 31 de entrada, una unidad 32 de visualización, y un controlador 33. El controlador 33 tiene una CPU, un almacenamiento que incluye ROM, RAM, y un disco duro, un lector para leer datos tal como un lector de CD-ROM, e interfaces de entrada y salida. En el almacenamiento del controlador 33, están instalados programas tales como programas de sistema operativo y de aplicación, y programas operativos para la transmisión de comandos de operación al controlador 24 del dispositivo 2 de medición mostrado en la figura 2, recepción y análisis de resultados de la operación de medición realizada por el dispositivo 2 de medición, y visualización de resultados del análisis. El dispositivo 3 de tratamiento de datos se conecta al controlador 24 del dispositivo 2 de medición para permitir la comunicación entre los mismos para que se transmitan y reciban datos hasta y desde el dispositivo 2 de medición y el dispositivo 3 de tratamiento de datos.

Mediante la ejecución de los programas instalados en el almacenamiento, la CPU del dispositivo 3 de tratamiento de datos obtiene parámetros característicos tales como intensidades de la luz dispersada hacia adelante y la luz fluorescente lateral basándose en las señales FSC, SSC y SFL. La CPU crea entonces datos de distribución de frecuencia usados para analizar las células y núcleos celulares basándose en los parámetros característicos obtenidos. Entonces, la CPU del dispositivo 3 de tratamiento de datos ejecuta un proceso de discriminación en partículas en la muestra de medición basándose en los datos de distribución de frecuencia para determinar la cancerización de las células.

[Etapas de análisis mediante analizador 1 de células]

Para analizar las células utilizando el analizador 1 de células, un operador del analizador de células coloca el recipiente 4 de muestra que contiene la biomuestra (células) y el medio que consiste principalmente en metanol en la unidad 2a de colocación de analito (véase la figura 2) para comenzar el análisis por el analizador 1 de células. A continuación en el presente documento, se describirán las etapas del análisis por el analizador 1 de células con referencia a la figura 4.

Cuando comienza la operación de medición, la unidad 10 de regulación de temperatura regula la temperatura del medio en primer lugar. Específicamente, la muestra en el recipiente 4 de muestra colocado en la unidad 2a de colocación de analito se aspira mediante la unidad 11 de pipeta de analito y se alimenta al interior del recipiente de muestra colocado en la parte 10a de colocación de muestra. Entonces, se regula la temperatura del medio en el recipiente de muestra a un grado predeterminado (etapa S1). La temperatura se regula mediante la unidad 10 de regulación de temperatura a una temperatura casi igual a o superior a la temperatura del aire del ambiente de una sala en la que está instalado el analizador 1 de células (temperatura del ambiente de instalación). La temperatura del

aire del ambiente de una sala en la que está instalado el analizador 1 de células, es normalmente aproximadamente de 22°C a 25°C (como mucho aproximadamente 30°C). La unidad 10 de regulación de temperatura según el ejemplo está configurado para calentar el medio hasta que la temperatura del mismo aumenta a aproximadamente 37°C. La unidad 10 de regulación de temperatura está configurada para calentar el medio durante 10 minutos. En el presente documento, la temperatura de conservación del medio, aunque está regulada para controlar la variabilidad de información óptica dependiente de la temperatura, no está estrictamente limitada con tal de que permanezca en el intervalo de desde 25°C hasta 50°C. Para controlar de manera más eficaz la variabilidad de información óptica dependiente de la temperatura, la temperatura de conservación del medio se regula preferiblemente a de 30°C a 45°C, más preferiblemente desde 35°C hasta 45°C, e incluso más preferiblemente desde 35°C hasta 40°C.

Cuando la temperatura del medio se regula así mediante la unidad 10 de regulación de temperatura, la temperatura del medio puede mantenerse a grados sustancialmente constantes independientemente de la temperatura de conservación del medio antes de alimentarse al analizador 1 de células. Esto acelera la fijación por alcohol de las células en el medio, estabilizando así a las células. Tal ventaja técnica puede controlar de manera eficaz la variabilidad dependiente de la temperatura de señales ópticas (información óptica) medida más tarde mediante la unidad 22 de detección principal y la unidad 13 de subdetección. Se realizaron pruebas para verificar que la variabilidad de las señales ópticas está provocada por cambios de la temperatura de conservación del medio, y que tal variabilidad de las señales ópticas podría controlarse regulando la temperatura del medio. Los detalles de estas pruebas se describirán en detalle a continuación. Para controlar de manera eficaz la variabilidad de las señales ópticas, se usaron los resultados de estas pruebas para optimizar un intervalo de grados y un periodo de tiempo que va a establecerse para la regulación de temperatura del medio mediante la unidad 10 de regulación de temperatura según el ejemplo.

La biomuestra conservada en el medio cuya temperatura se regula mediante la unidad 10 de regulación de temperatura, se somete entonces al tratamiento de dispersión realizado por la primera unidad 12 de dispersión (primer tratamiento de dispersión) para dispersar células agregadas en la muestra (etapa S2). Específicamente, la muestra en el recipiente de muestra colocado en la parte 10a de colocación de muestra de la unidad 10 de regulación de temperatura se aspira mediante la unidad 11 de pipeta de analito y se alimenta al interior de la parte 12a de recipiente de muestra. Entonces, la muestra en la parte 12a de recipiente de muestra se dispersa mediante la primera unidad 12 de dispersión.

Cuando se acaba el primer tratamiento de dispersión, la unidad 11 de pipeta de analito alimenta la muestra de dispersión completada al interior de la parte 13a de recogida de muestra de la unidad 13 de subdetección, y una cantidad predeterminada de la muestra de dispersión completada se hace fluir al interior de la célula de flujo de la unidad 13 de subdetección similar a la célula 43 de flujo mostrada en la figura 3A. La unidad 13 de subdetección detecta el recuento celular de células epiteliales en la muestra (pre-medición) mediante citometría de flujo (etapa S3). Según el ejemplo, la concentración de la muestra se calcula basándose en el recuento celular de células epiteliales y el volumen de la muestra alimentada a la unidad 13 de subdetección.

A continuación, el controlador 24 decide una cantidad de muestra que va a aspirarse basándose en la concentración calculada para preparar la muestra de medición usada en la operación de medición (etapa S4). Es decir, se calcula una cantidad de muestra por medida líquida necesaria para la operación de medición basándose en la concentración de la muestra usada en la pre-medición (recuento celular por unidad de volumen) y el recuento celular de células epiteliales necesario para detectar cualquier célula cancerosa en la operación de medición. Según el ejemplo, el recuento celular de células epiteliales que va a alimentarse al interior de la célula 43 de flujo de la unidad 22 de detección principal es un recuento celular predeterminado (A). En este caso, es necesario que el recuento celular de células epiteliales en la muestra alimentada a la unidad 14 de discriminación y sustitución sea un recuento celular (B) superior al recuento celular predeterminado (A). Por tanto, la cantidad de muestra por medida líquida se calcula en la etapa S4 para que el recuento celular (B), que es superior al recuento celular predeterminado (A), de células epiteliales se alimenten a la unidad 14 de discriminación y sustitución.

A continuación, la muestra en la cantidad calculada por medida líquida se somete a un tratamiento de discriminación y sustitución (etapa S5). Es decir, la unidad 11 de pipeta de analito se acciona mediante el controlador 24 para aspirar la muestra tras realizarse el primer tratamiento de dispersión a la misma mediante la primera unidad 12 de dispersión. La unidad 11 de pipeta de analito aspira la muestra de dispersión completada en la cantidad exacta calculada anteriormente desde la parte 12a de recipiente de muestra de la primera unidad 12 de dispersión. La muestra aspirada se alimenta a la unidad 14 de discriminación y sustitución, en respuesta a lo cual comienza el tratamiento de discriminación y sustitución.

A continuación, las células agregadas en la muestra se dispersan mediante la segunda unidad 16 de dispersión (segundo tratamiento de dispersión) (etapa S6). Específicamente, la unidad 15 de transporte de recipiente sujeta y retira el recipiente 5 de muestra de medición de la parte 18b de retención de la unidad 18 de reacción, y entonces sitúa el recipiente 5 de muestra de medición en la parte 11b de entrega y recepción de muestra. Entonces, la muestra aspirada de la unidad 14 de discriminación y sustitución mediante la unidad 11 de pipeta de analito se alimenta al interior del recipiente 5 de muestra de medición situado en la parte 11b de entrega y recepción de muestra. Entonces, el recipiente 5 de muestra de medición que contiene la muestra se transporta mediante la unidad

15 de transporte de recipiente a la segunda unidad 16 de dispersión, y la muestra en la misma se somete al segundo tratamiento de dispersión.

5 Cuando se acaba el segundo tratamiento de dispersión, el recipiente 5 de muestra de medición que contiene la muestra de dispersión completada se coloca en la parte 18b de retención de la unidad 18 de reacción. Entonces, el reactivo (que incluye RNasa, denominada a continuación en el presente documento agente de aislamiento de ARN) se añade a la muestra mediante la primera unidad 19 de adición de reactivo. Entonces, el recipiente 5 de muestra de medición se calienta mediante la unidad 18 de reacción, y las células que van a medirse en el recipiente 5 de muestra de medición se someten al tratamiento de aislamiento de ARN (etapa S7). Tras realizarse el tratamiento de aislamiento de ARN, el reactivo (solución de tinción) se añade a la muestra mediante la segunda unidad 20 de adición de reactivo. Entonces, el recipiente 5 de muestra de medición se calienta mediante la unidad 18 de reacción, y las células que van a medirse en el recipiente 5 de muestra de medición se someten a la tinción de ADN (etapa S8). Según la presente realización, el recuento celular de células significativas necesario para la operación de medición es sustancialmente constante debido a la pre-medición. Cuando las células se tiñen, por tanto, un grado de tinción es menos variable de una operación de medición a otra. Según la presente realización, la temperatura del medio se regula para ser sustancialmente constante en la etapa de regulación de temperatura (etapa S1). Esto acelera la degeneración de cromatina incluida en las células del medio, estabilizando así a las células. Como resultado, el grado de tinción se hace menos variable.

20 A continuación, la muestra de medición de ADN teñido se aspira mediante la unidad 21 de aspiración de muestra. La muestra de medición aspirada se transfiere a la célula 43 de flujo de la unidad 22 de detección principal (véase la figura 3A) para realizar la operación de medición a las células en la muestra de medición (etapa S9).

25 Cuando se acaba la operación de medición, los datos medidos obtenidos por la misma se transmiten desde el controlador 24 del dispositivo 2 de medición al dispositivo 3 de tratamiento de datos (etapa S10). Específicamente, la señal de luz dispersada hacia adelante (FSC), la señal de luz dispersada lateral (SSC) y la señal de luz fluorescente lateral (SFL) obtenida de cada célula de la muestra de medición se transmiten al dispositivo 3 de tratamiento de datos. El controlador 33 (CPU) del dispositivo 3 de tratamiento de datos detecta constantemente si los datos medidos se reciben desde el dispositivo 2 de medición. Cuando los datos medidos se reciben por el dispositivo 2 de medición, el controlador 33 del dispositivo 3 de tratamiento de datos ejecuta el análisis basándose en los datos medidos (etapa S11). Los detalles del análisis en la etapa S11 se describirán a continuación con referencia a las figuras 7 y 8.

35 [Etapas de obtención de información de cancerización]

A continuación, se describen las etapas de obtención de información de cancerización según la presente realización.

40 La figura 5A es un diagrama de la señal de luz dispersada hacia adelante (FSC) y la señal de luz fluorescente lateral (SFL) obtenidas en la operación de medición (etapa S9 en la figura 4). La figura 5A muestra esquemáticamente una célula que incluye el núcleo celular y formas de onda de una señal de luz dispersada hacia adelante y una señal de luz fluorescente lateral obtenida de la célula. El eje longitudinal representa intensidades de las luces. La anchura de la forma de onda de la intensidad de luz dispersada hacia adelante tiene un valor que representa la anchura celular (tamaño celular C). La anchura de forma de onda de la intensidad de luz fluorescente lateral representa un valor que representa la anchura de núcleo celular (tamaño de núcleo celular N). Tal como se muestra con una parte sombreada, una dimensión de área de una zona definida por la forma de onda de la intensidad de luz fluorescente lateral y una línea base predeterminada representa el contenido de ADN de la célula.

50 La figura 5B es una vista ampliada esquemática en sección transversal de células epiteliales en cuello uterino. Tal como se muestra en la figura 5B, el cuello uterino tiene capas, desde el lado de membrana basal; una capa formada por células basales (capa basal), una capa formada por células parabasales (capa parabasal), una capa formada por células intermedias (capa intermedia) y una capa formada por células superficiales (capa superficial). Las células basales cerca de la membrana basal se diferencian en las células parabasales, las células parabasales se diferencian en las células intermedias, y las células intermedias se diferencian en las células superficiales.

55 En el transcurso de desarrollo del cáncer, las células basales adquieren displasia, transformándose en células displásicas. Las células displásicas adquieren potencia de proliferación, ocupando una zona desde el lado de capa basal hasta el lado de capa superficial. En células epiteliales en cuello uterino, por tanto, están presentes células cancerosas en números grandes entre las células de la capa basal, la capa parabasal y la capa intermedia en un estadio temprano del desarrollo del cáncer. Sin embargo, en un estadio temprano del desarrollo del cáncer, hay un número significativamente inferior de células cancerosas en el lado de capa superficial de células epiteliales en cuello uterino.

65 Se sabe que el tamaño celular de células epiteliales se hace más pequeño pero el tamaño de núcleo celular de las mismas se hace más grande desde la capa superficial hacia las capas en el lado de membrana basal. Por tanto, una relación del tamaño de núcleo celular (N) al tamaño celular (C) (denominada a continuación en el presente documento "relación N/C ") se hace por consiguiente más grande desde la capa superficial hacia las capas en el

lado de membrana basal. La relación N/C y el tamaño celular C, por tanto, tienen una relación tal como se muestra en la figura 5C. En el presente documento, las células epiteliales en cuello uterino que pueden recogerse de sujetos de prueba son las células de la capa parabasal, capa intermedia y capa superficial. Tal como se describió anteriormente, la lesión precancerosa se desarrolla en las células en el lado de capa basal en un estadio temprano.

La figura 6A es un diagrama que muestra una relación entre el recuento celular y el contenido de ADN en un ciclo celular. Tal como se muestra en la figura 6A, una célula, según un cierto ciclo (ciclo celular), se divide en dos células a través de eventos tales como duplicación de ADN, partición de cromosomas, fisión de núcleo celular, y fisión citoplasmática, y entonces de vuelta a donde comenzó. El ciclo celular puede dividirse en cuatro fases; fase G1 (fase de preparación y comprobación para entrar en la fase S), fase S (fase de síntesis de ADN), fase G2 (fase de preparación y comprobación para entrar en la fase M) y fase M (fase de división celular). Junto con estos cuatro ciclos, hay una fase G0 en la que se detiene la proliferación celular (fase de descanso), y por tanto hay cinco fases en total. En función del estadio de una célula, la célula está en cualquiera de estas fases.

Cuando una célula está proliferándose a través del ciclo celular, el cromosoma nuclear de la célula aumenta también. Por tanto, la fase actual de la célula en el ciclo celular puede estimarse midiendo el contenido de ADN de la célula. Describiendo el contenido de ADN de una célula normal con referencia a la figura 6B, el contenido de ADN tiene un valor constante (2C) en la fase G0/G1. En la fase S siguiente, el contenido de ADN aumenta gradualmente. En la fase G2 siguiente, el contenido de ADN tiene un valor constante (4C), y el valor permanece inalterado en la fase M. En el presente documento, el valor C representa el contenido de ADN genómico por haploide. Es decir, 2C representa el contenido de ADN dos veces superior al contenido de ADN genómico por haploide, y 4C representa el contenido de ADN cuatro veces superior al contenido de ADN genómico por haploide. El contenido de ADN de una célula normal en la fase G0 o la fase G1 del ciclo celular es 2C. Se dibujó un histograma del contenido de ADN de células normales, tal como se muestra en la figura 6A. El pico más alto en el histograma representa una célula en la fase G0/G1 con el contenido de ADN más pequeño. El segundo pico más alto representa una célula en la fase G2/M con el contenido de ADN más grande. Un intervalo entre estos picos representa células en la fase S.

En células normales, el recuento celular de células en la fase S y la fase G2/M es significativamente inferior al recuento celular de células en la fase G0/G1. Sin embargo, en células cancerosas, el recuento celular de células en la fase S y la fase G2/M es superior al de células normales. Además, el número cromosómico aumenta en células cancerosas, lo que también aumenta el contenido de ADN.

La presente realización, por tanto, emplea un método de detección que se centra en la relación N/C y el contenido de ADN para determinar si las células son cancerosas.

Específicamente, el método de detección es extraer cualquier célula con valores grandes de la relación N/C. Entonces, de las células extraídas, se identifican las células con contenido de ADN grande y las células con contenido de ADN pequeño, para que las células que tienen más probabilidad de ser cancerosas (primeras células) y las células con menos probabilidad de ser cancerosas (segundas células) se extraigan de manera eficaz. Generalmente, las primeras células aumentan mientras que las segundas células disminuyen con el crecimiento de tejidos cancerosos. Comparando tejidos cancerosos con tejidos normales, una relación del recuento celular de primeras y segundas células difiere mucho. Por tanto, la cancerización se determina basándose en la relación. Usando la relación de dos tipos diferentes de células que aumentan y disminuyen en proporción inversa entre sí, pueden obtenerse resultados de detección altamente fiables incluso de muestras de medición con menos células diana.

Específicamente, el controlador 33 del dispositivo 3 de tratamiento de datos dibuja un diagrama de dispersión que indica una relación entre la relación N/C y el tamaño celular (anchura celular) tal como se muestra en la figura 7. Entonces, el controlador 33 extrae datos medidos como datos que van a analizarse de cualquier célula cuyo tamaño celular está dentro de un intervalo predeterminado (por ejemplo, igual o superior a 10 μm e igual o inferior a 50 μm) y cuya relación N/C está dentro de un intervalo predeterminado (por ejemplo, igual o superior a 0,2 e igual o inferior a 1). Esto excluye las células superficiales presentes en la capa superficial con un número menor de células cancerosas a partir de los datos que van a analizarse. En el presente documento, pueden realizarse procesos antes de extraer las células; por ejemplo, un proceso para dividir los datos medidos de glóbulos blancos y células epiteliales, o un proceso para dividir los datos medidos de células epiteliales únicas y células epiteliales agregadas. El tamaño celular puede descartarse, y el intervalo de relación N/C por sí mismo, puede usarse para extraer los datos medidos de las células.

A continuación, el controlador 33 del dispositivo 3 de tratamiento de datos dibuja un histograma mostrado en la figura 8 basándose en los datos medidos extraídos de las células. En el histograma, el eje lateral representa el contenido de ADN, y el eje longitudinal representa el recuento celular.

El controlador 33 del dispositivo 3 de tratamiento de datos obtiene en el histograma de la figura 8 un recuento celular N1 de las células cuyo contenido de ADN es superior al de células normales en la fase S (recuento celular de células cuyo contenido de ADN es superior a "b" e igual o inferior a "c"). El recuento celular N1 es, en otras palabras, el recuento celular de células cuyo contenido de ADN supera el contenido de ADN de células normales en la fase G0 o

la fase G1 del ciclo celular, tal como se muestra en la figura 6A. El controlador 33 obtiene además un recuento celular N2 de células cuyo contenido de ADN es igual a 2C de células normales (recuento celular de células cuyo contenido de ADN es igual o superior a "a" e igual o inferior a "b"). El recuento celular N2 es, en otras palabras, el recuento celular de células cuyo contenido de ADN es igual al de células normales en la fase G0 o la fase G1 del ciclo celular.

Entonces, el controlador 33 del dispositivo 3 de tratamiento de datos obtiene un valor calculado dividiendo el recuento celular N1 de células cuyo contenido de ADN es igual o superior al de células normales en la fase S mediante el recuento celular N2 de células cuyo contenido de ADN es 2C (relación de los recuentos celulares N1 y N2 (N1/N2)). Además, el controlador 33 determina si las células son cancerosas comparando la relación de los recuentos celulares N1 y N2 con un umbral predeterminado. Los criterios de cancerización son; el valor de N1/N2 igual o superior al umbral predeterminado se determina como positivo, mientras que el valor de N1/N2 inferior al umbral predeterminado se determina como negativo.

Entonces, el controlador 33 del dispositivo 3 de tratamiento de datos presenta la información de cancerización obtenida en la unidad 32 de visualización o da como salida la información a un dispositivo externo. Por ejemplo, cuando el valor se determina como positivo se presenta una indicación de que se requiere una reexaminación en la unidad 32 de visualización. Cuando el valor se determina como negativo se presenta una indicación de que no se requiere una reexaminación en la unidad 32 de visualización.

[Condiciones de regulación de temperatura por la unidad 10 de regulación de temperatura]

Tal como se describió anteriormente, la unidad 10 de regulación de temperatura del dispositivo 2 de medición regula la temperatura del medio a un grado predeterminado antes de transportar la biomuestra a la unidad 22 de detección principal o la unidad 13 de subdetección. Las señales ópticas obtenidas por la unidad 22 de detección principal y la unidad 13 de subdetección pueden hacerse variables en el caso en el que cambie la temperatura del medio, y como resultado, la variabilidad implica el riesgo de imprecisión en la determinación de cancerización basándose en las señales ópticas. Por ejemplo, la variabilidad de la señal de luz fluorescente lateral y la señal de luz dispersada hacia adelante lleva a la variabilidad del tamaño de núcleo celular N y el tamaño celular C, posiblemente afectando de manera adversa el proceso de dibujar el diagrama de dispersión mostrado en la figura 7. Además, la variabilidad de la señal de luz fluorescente lateral lleva a la variabilidad del contenido de ADN de las células. Esto lleva al fallo en dibujar de manera precisa el histograma mostrado en la figura 8, posiblemente afectando de manera adversa la determinación de cancerización. Especialmente, la intensidad de la señal de luz fluorescente lateral cambia en función de un grado de tinción de ADN. En vista de este hecho, es probable que temperaturas no uniformes del medio afecten de manera adversa el grado de tinción de ADN.

Los inventores de la presente invención realizaron las pruebas descritas a continuación en el presente documento y verificaron así que la variabilidad de las señales ópticas podría controlarse regulando la temperatura del medio que contiene la biomuestra a un intervalo predeterminado de grados de temperatura. Los inventores también obtuvieron la temperatura de regulación y el tiempo de regulación que controlan de manera eficaz la variabilidad de las señales ópticas. Además, los inventores verificaron los efectos de la regulación de temperatura cuando se cambia una concentración de alcohol del medio. Las pruebas se describirán en detalle a continuación en el presente documento. Las pruebas 1 y 2 descritas a continuación se realizaron en células epiteliales en cuello uterino. La prueba 3 se realizó en células epiteliales en mucosa oral (denominadas a continuación en el presente documento "células orales").

Prueba 1

El protocolo de la prueba 1 se describe a continuación.

1. Materiales

(Biomuestra) Como biomuestra, se usaron células cultivadas; células Hela obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC).

(Solución de tinción) Como solución de tinción, se usó una disolución en la que PI (yoduro de propidio) suministrado por Sigma se diluyó con etilenglicol.

(Agente de aislamiento de ARN) Como agente de aislamiento de ARN, se usó una disolución en la que RNasa suministrada por Sigma se diluyó con una disolución de ácido Tris hidráulico (pH 7,5, 10 mM).

(Medio) Se prepararon cuatro medios diferentes y se usaron según las células diana que iban a someterse a prueba;

medio 1: disolución acuosa que contiene metanol al 40% en volumen y ácido acético al 0,8 % en volumen,

medio 2: disolución acuosa que contiene etanol al 40% en volumen y ácido acético al 0,8 % en volumen,

medio 3: disolución acuosa que contiene metanol al del 25 al 80 % en volumen y ácido acético al 0,8 % en volumen, y

medio 4: disolución acuosa que contiene etanol al del 25 al 80 % en volumen y ácido acético al 0,8 % en volumen.

(Diluyente) Se usó la disolución de ácido Tris hidrúlico (pH 7,5, 10 mM).

2. Condiciones

(Condiciones de conservación) Los medios, en los que se conservaron las células cultivadas, se dejaron en reposo a 4°C o 30°C durante 24 horas. En la práctica clínica, los medios que contienen células se conservan normalmente de 4°C a 30°C hasta realizar las pruebas. Los medios usados en estas pruebas se dejaron en reposo en el grado más bajo (4°C) o el grado más alto (30°C) en un intervalo de temperaturas de conservación normalmente empleado.

(Condiciones de regulación de temperatura) Después de dejar los medios en reposo tal como se describió, las temperaturas de los medios se regularon en tres patrones diferentes descritos a continuación;

- patrón 1: calentado durante 10 minutos a uno de los grados de temperatura de regulación seleccionado del intervalo de 30°C a 50°C,

- patrón 2: calentado a la temperatura de regulación de 37°C durante 10 minutos, y

- patrón 3: calentado a la temperatura de regulación de 37°C durante uno de los periodos de tiempo seleccionado del intervalo de 3 a 20 minutos.

3. Procedimientos de prueba

Las células cultivadas conservadas en los medios durante 24 horas se calentaron a las temperaturas de regulación en un microtubo y se sometieron a separación centrífuga (10000 rpm, 1 min.). Entonces, se eliminó el sobrenadante de los medios mediante un aspirador. A continuación, se añadió 1 ml del diluyente a las disoluciones residuales (30 µl). Entonces, los medios se sometieron de nuevo a separación centrífuga (10000 rpm, 1 min.), y se eliminó el sobrenadante de los medios mediante el aspirador. La solución de tinción, el agente de aislamiento de ARN, y el diluyente se añadieron a las disoluciones residuales (30 µl) para preparar muestras de medición. Entonces, las muestras de medición preparadas se dejaron en reposo en las condiciones de regulación de temperatura (cualquiera de los patrones 1 a 3). A continuación, las muestras de medición se hicieron fluir al interior de un citómetro de flujo para obtener las señales ópticas (señal de luz fluorescente lateral, señal de luz dispersada hacia adelante). Entonces, se compararon las señales ópticas obtenidas de los medios respectivamente conservados a 4°C y 30°C para determinar cualquier variabilidad de las señales ópticas.

Resultados de prueba

(Prueba 1-1)

Esta prueba se realizó para determinar la variabilidad de una cantidad de fluorescencia entre el medio 1 (disolución basada en metanol) que contiene las células y de temperatura regulada al intervalo de 30°C a 50°C, y el mismo medio cuya temperatura no estaba regulada (a 4°C o 30°C sin calentamiento). La cantidad de fluorescencia se representa por una dimensión de área de la forma de onda de la señal de luz fluorescente lateral. Hay correlación entre la cantidad de fluorescencia y el contenido de ADN de la célula: la cantidad de fluorescencia aumenta a medida que aumenta el contenido de ADN. Esta prueba y otras pruebas descritas a continuación en el presente documento obtuvieron variabilidad de la cantidad de fluorescencia (valor X) cuando 2C en la figura 8 mostró un pico.

Tal como se muestra en la figura 9, el resultado de esta prueba con el medio no calentado mostró que las relaciones de aproximadamente 105% entre la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 4°C y la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 30°C (la relación (porcentaje) se calculó dividiendo una cantidad mayor de fluorescencia por una cantidad menor de fluorescencia). Según el resultado, la cantidad de fluorescencia se hace más variable a medida que aumenta la relación.

Mientras tanto, la temperatura del medio se reguló durante 10 minutos a seis grados diferentes (30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C y 50°C) seleccionados del intervalo de 30°C a 50°C. En todos estos casos, las relaciones entre la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 4°C y la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 30°C fueron menores que el resultado obtenido con el medio no calentado. Esto demuestra que la regulación de temperatura al intervalo de 30°C a 50°C puede reducir la variabilidad de la cantidad de fluorescencia debida a diferentes temperaturas de conservación. La relación de fluorescencia fue particularmente pequeña en el intervalo de 30°C a 45°C, e incluso más pequeña en el intervalo de 35°C a 40°C. Se descubrió que, en la regulación de temperatura a 37°C, la relación de fluorescencia se redujo al 101% o menos, lo que fue el mejor resultado. Basándose en el resultado, la temperatura de conservación en la unidad 10 de regulación de temperatura según la

presente realización se fijó en 37°C. En las pruebas 1-2 a 2-3 descritas a continuación en el presente documento, la temperatura de conservación también se fijó en 37°C, lo que se esperó que lograra el mejor resultado.

(Prueba 1-2)

5 Esta prueba se realizó en la variabilidad de una cantidad de fluorescencia entre el medio 2 (disolución basada en etanol) que contiene las células y de temperatura regulada a 37°C durante 10 minutos y el mismo medio cuya temperatura no estaba regulada.

10 Tal como se muestra en la figura 10, el resultado de esta prueba mostró las relaciones de aproximadamente el 102% entre la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 4°C y la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 30°C. Estas relaciones fueron menores que el resultado con el medio no calentado (108% al 109%). Se demostró que la regulación de temperatura reduce la variabilidad de fluorescencia debido a diferentes temperaturas de conservación. El resultado de esta prueba indica que la regulación de temperatura es eficaz independientemente de los tipos de alcoholes usados en el medio como su material de base.

(Prueba 1-3)

20 Esta prueba se realizó en la variabilidad de un diámetro celular (tamaño celular C, véase la figura 5A) calculado a partir de la señal de luz dispersada hacia adelante entre el medio 1 que contiene las células y de temperatura regulada a 37°C durante 10 minutos y el mismo medio cuya temperatura no estaba regulada.

25 Tal como se muestra en la figura 11, el resultado de esta prueba mostró las relaciones de aproximadamente el 102% entre el diámetro celular obtenido del medio conservado a 4°C y el diámetro celular obtenido del medio conservado a 30°C. Estas relaciones fueron menores que el resultado con el medio no calentado (105% al 106%). El resultado de esta prueba demostró que la regulación de temperatura puede reducir la variabilidad del diámetro celular debida a diferentes temperaturas de conservación.

(Prueba 1-4)

30 Esta prueba se realizó en la variabilidad de un diámetro de núcleo celular (tamaño de núcleo celular N, véase la figura 5A) calculado a partir de la señal de luz fluorescente lateral entre el medio 1 que contiene las células y de temperatura regulada a 37°C durante 10 minutos y el mismo medio cuya temperatura no estaba regulada.

35 Tal como se muestra en la figura 12, el resultado de esta prueba mostró las relaciones del 100,0% al 100,4% entre el diámetro de núcleo celular obtenido del medio conservado a 4°C y el diámetro de núcleo celular obtenido del medio conservado a 30°C. Estas relaciones fueron menores que el resultado con el medio no calentado (101,6% al 102,0%). Se demostró que la regulación de temperatura reduce la variabilidad del diámetro de núcleo celular debida a diferentes temperaturas de conservación.

40 Se descubrió a partir de los resultados de las pruebas 1-3 y 1-4 que la regulación de temperatura del medio debería reducir la variabilidad de la relación N/C.

(Prueba 1-5)

45 Esta prueba se realizó en la variabilidad de una cantidad de fluorescencia en los medios 3 plurales respectivamente que contienen metanol en diferentes concentraciones y de temperatura regulada a 37°C durante 10 minutos y los mismos medios cuyas temperaturas no estaban reguladas.

50 En cualquiera de los medios independientemente de las concentraciones de metanol de los mismos, el resultado de esta prueba confirmó que una relación entre la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 4°C y la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 30°C fue menor que el resultado con el medio no calentado, tal como se muestra en la figura 13. Este resultado de prueba indica que la ventaja de la regulación de temperatura puede obtenerse independientemente de las concentraciones de metanol.

(Prueba 1-6)

60 Esta prueba se realizó en la variabilidad de una cantidad de fluorescencia en los medios 4 plurales respectivamente que contienen etanol en diferentes concentraciones y de temperatura regulada a 37°C durante 10 minutos y los mismos medios cuyas temperaturas no estaban reguladas.

65 En cualquiera de los medios que contienen etanol en diferentes concentraciones, el resultado de esta prueba confirmó que una relación entre la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 4°C y la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 30°C fue menor que el resultado con el medio no calentado, tal como se muestra en la figura 14. Este resultado de esta prueba indica que la regulación de temperatura es muy eficaz independientemente de las concentraciones de etanol.

(Prueba 1-7)

5 Esta prueba se realizó en la variabilidad de una cantidad de fluorescencia entre el medio 1 que contiene las células y de temperatura regulada a 37°C durante diferentes periodos de tiempo de regulación de temperatura (de 3 a 20 minutos) y el mismo medio cuya temperatura no estaba regulada (regulación de temperatura time = 0 minutos).

10 Independientemente del periodo de tiempo de regulación de temperatura, el resultado de esta prueba confirmó que una relación entre la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 4°C y la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 30°C fue menor que el resultado con el medio no calentado, tal como se muestra en la figura 15A. Se demostró que la regulación de temperatura reduce la variabilidad de fluorescencia debida a diferentes temperaturas de conservación. La figura 15B muestra también cambios de temperatura del medio cuando se regula para diferentes periodos de tiempo de regulación de temperatura. El dibujo enseña que la temperatura del medio sustancialmente aumentó a 37°C, que era la temperatura de regulación objetivo, en tres minutos tras comenzar la regulación de temperatura y, por consiguiente, se redujo la variabilidad de fluorescencia. El resultado de esta prueba muestra que la variabilidad de fluorescencia se minimizó en 10 minutos tras comenzar la regulación de temperatura. Por tanto, basándose en el resultado, se fijó 10 minutos en la unidad 10 de regulación de temperatura según la presente realización como el tiempo medio de regulación de temperatura.

20 Prueba 2

El protocolo de la prueba 2 se describe a continuación.

1. Materiales

25 (Biomuestra) Como biomuestra, se recogieron analitos clínicos que incluían células epiteliales de los cuellos uterinos de tres pacientes con cáncer de cuello uterino, respectivamente denominados analitos clínicos 1 a 3.

(Solución de tinción) Se usó la misma solución de tinción que en la prueba 1.

30 (Agente de aislamiento de ARN) Se usó el mismo agente de aislamiento de ARN que en la prueba 1.

(Medio) Se usaron los mismos medios que el medio 1 de la prueba 1.

35 (Diluyente) Se usó el mismo diluyente que en la prueba 1.

2. Condiciones

40 (Condiciones de conservación) Los medios, en los se conservaron los analitos clínicos, se dejaron en reposo a 4°C o 30°C durante siete días.

(Condiciones de regulación de temperatura) Los medios se dejaron así en reposo y entonces se calentaron a la temperatura de regulación de 37°C durante 10 minutos.

3. Procedimientos de prueba

45 Las muestras se prepararon de una manera similar a la prueba 1 usando los analitos clínicos conservados en los medios. Las muestras preparadas se dejaron en reposo en las condiciones de regulación de temperatura descritas anteriormente. A continuación, las muestras de medición se hicieron fluir respectivamente al interior de un citómetro de flujo para obtener las señales ópticas (señal de luz fluorescente lateral, señal de luz dispersada hacia adelante).
50 Entonces, se compararon las señales ópticas obtenidas de los medios respectivamente conservados a 4°C y 30°C para determinar cualquier variabilidad de las señales ópticas.

Resultados de prueba

55 Esta prueba se realizó en la variabilidad de una cantidad de fluorescencia entre los medios respectivamente que contienen los analitos clínicos 1 a 3 y de temperatura regulada a 37°C durante 10 minutos y los mismos medios cuyas temperaturas no estaban reguladas.

60 Según el resultado de esta prueba, una relación entre la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 4°C y la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 30°C era del 104,0% con el analito clínico 1, del 102,1% con el analito clínico 2 y del 104,4% con el analito clínico 3 tal como se muestra en la figura 16. Estas relaciones fueron menores que el resultado con los medios no calentados (108,2%, 106,5% y 106,7%). Por tanto, este resultado de prueba demuestra que la regulación de temperatura puede reducir la variabilidad de fluorescencia debida a diferentes temperaturas de conservación, incluso con cualquiera de los analitos clínicos recogidos de
65 pacientes con cáncer de cuello uterino.

Prueba 3

El protocolo de la prueba 3 en células orales se describe a continuación.

5 1. Materiales

(Biomuestra) Las células orales se recogieron en las siguientes etapas.

10 Se impregnó el hisopo con una cantidad adecuada de saliva, y se frotó el hisopo contra la cavidad bucal durante 10 segundos (uno para el lado de la mejilla derecha y uno para el lado de la mejilla izquierda, se usaron dos hisopos en total). El hisopo frotado contra la cavidad bucal se colocó inmediatamente en 2,2 ml del medio en un recipiente que tenía una capacidad de 5,0 ml. El recipiente entonces se giró para lavar las células fuera del hisopo. Entonces, se dispensaron 440 µl del medio en cada uno de los microtubos que tenían una capacidad de 1,5 ml.

15 (Solución de tinción) Se usó la misma solución de tinción que en la prueba 1.

(Agente de aislamiento de ARN) Se usó el mismo agente de aislamiento de ARN que en la prueba 1.

20 (Medio) Disolución acuosa que contiene metanol al 40 % en volumen y ácido acético al 0.8 % en volumen.

2. Condiciones

(Condiciones de conservación) Los medios, en los que se conservaron células orales, se dejaron en reposo a 4°C o 30°C durante 24 horas.

25 (Condiciones de regulación de temperatura) Los medios se dejaron así en reposo y entonces se calentaron a la temperatura de regulación de 37°C durante 10 minutos.

3. Procedimientos de prueba

30 Las muestras de medición se prepararon de una manera similar a las de la prueba 1, y las muestras preparadas se hicieron fluir respectivamente al interior de un citómetro de flujo para obtener señales ópticas (señal fluorescente lateral, señal de luz dispersada hacia adelante). Entonces, se compararon las señales ópticas obtenidas de los medios respectivamente conservados a 4°C y 30°C para determinar cualquier variabilidad de las señales ópticas.

35 Resultados de prueba

(Prueba 3-1)

40 Esta prueba se realizó en la variabilidad de una cantidad de fluorescencia entre el medio que contiene las células orales y de temperatura regulada a 37°C durante 10 minutos y el mismo medio cuya temperatura no estaba regulada.

45 Tal como se muestra en la figura 17, el resultado de esta prueba mostró las relaciones del 103% al 104% entre la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 4°C y la cantidad de fluorescencia obtenida del medio conservado a 30°C. Estas relaciones fueron menores que el resultado con el medio no calentado (105% al 106%). Por tanto, se demostró que la regulación de temperatura reduce la variabilidad de fluorescencia debida a diferentes temperaturas de conservación.

50 (Prueba 3-2)

Esta prueba se realizó en la variabilidad de un diámetro celular (tamaño celular C, véase la figura 5A) calculado a partir de la señal de luz dispersada hacia adelante entre el medio que contiene las células orales y de temperatura regulada a 37°C durante 10 minutos y el mismo medio cuya temperatura no estaba regulada.

55 Tal como se muestra en la figura 18, el resultado de esta prueba mostró las relaciones de aproximadamente el 102% entre el diámetro celular obtenido del medio conservado a 4°C y el diámetro celular obtenido del medio conservado a 30°C. Estas relaciones fueron menores que el resultado con el medio no calentado (105% al 106%). Por tanto, se demostró que la regulación de temperatura reduce la variabilidad del diámetro celular debida a diferentes temperaturas de conservación.

(Prueba 3-3)

65 Esta prueba se realizó en la variabilidad de un diámetro de núcleo celular (tamaño de núcleo celular N, véase la figura 5A) calculado a partir de la señal de luz fluorescente lateral entre el medio que contiene las células orales y de temperatura regulada a 37°C durante 10 minutos y el mismo medio cuya temperatura no estaba regulada.

Tal como se muestra en la figura 19, el resultado de esta prueba mostró las relaciones del 100,0% al 100,5% entre el diámetro de núcleo celular obtenido del medio conservado a 4°C y el diámetro de núcleo celular obtenido del medio conservado a 30°C. Estas relaciones fueron menores que el resultado con el medio no calentado (101,0% al 101,5%). Por tanto, se demostró que la regulación de temperatura reduce la variabilidad del diámetro de núcleo celular debida a diferentes temperaturas de conservación.

El resultado de la prueba 3 confirmó que la variabilidad de las señales ópticas debida a diferentes temperaturas del medio podría controlarse con células epiteliales de mucosa oral así como células epiteliales de cuello uterino cuando la temperatura del medio se reguló a grados predeterminados. Como resultado, puede obtenerse de manera precisa información de las células, tales como contenido de ADN, tamaño celular, y tamaño de núcleo celular.

La invención no se limita necesariamente a la realización sino que puede modificarse adecuadamente dentro del alcance de la invención enunciado en las reivindicaciones adjuntas.

Aunque el analizador de células se usa para analizar células epiteliales en cuello uterino, el analizador de células también puede usarse para, por ejemplo, analizar células epiteliales de mucosa oral, tal como se demostró mediante la prueba 3. El analizador de células puede usarse para analizar células epiteliales de, por ejemplo, vejiga, faringe u otros órganos.

Según la realización, la relación N/C se calcula como la relación entre el valor que representa la anchura de núcleo celular obtenida basándose en la anchura de forma de onda de la intensidad de luz fluorescente lateral (tamaño de núcleo celular N) y el valor que representa la anchura celular obtenida basándose en la anchura de forma de onda de la intensidad de luz dispersada hacia adelante (tamaño celular C). La relación N/C no se limita necesariamente a la misma, y puede calcularse como una relación entre área de núcleo celular y área celular. Según la realización, el valor que representa la anchura celular se obtuvo basándose en la anchura de forma de onda de la intensidad de luz dispersada hacia adelante (tamaño celular C). Esto permite la medición precisa de tamaño celular en el caso en el que las células que fluyen en la célula de flujo se alargaran en una dirección dada.

Tal como se describe hasta ahora, el medio según la presente realización no está particularmente limitado siempre que se puedan conservar las células en el mismo. Sin embargo, el medio contiene alcohol. Aunque el alcohol incluido en el medio según la presente realización no está particularmente limitado, ejemplos del alcohol son metanol y etanol. La concentración de alcohol del medio según la presente realización no está particularmente limitada tal como se describe en las pruebas 1-5 y 1-6. Sin embargo, es preferible que la concentración de alcohol sea igual o superior al 25% en volumen con respecto a la conservación de las células porque las concentraciones de alcohol inferiores al 25% en volumen provocan citoclasia fácilmente. Por otro lado, es probable que concentraciones de alcohol superiores al 60% causen agregación de las células. Por tanto, es preferible que la concentración de alcohol sea igual o inferior al 60% en volumen cuando las células se miden mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo. En resumen, es preferible que la concentración de alcohol del medio sea igual o superior al 25% en volumen e igual o inferior al 60% en volumen.

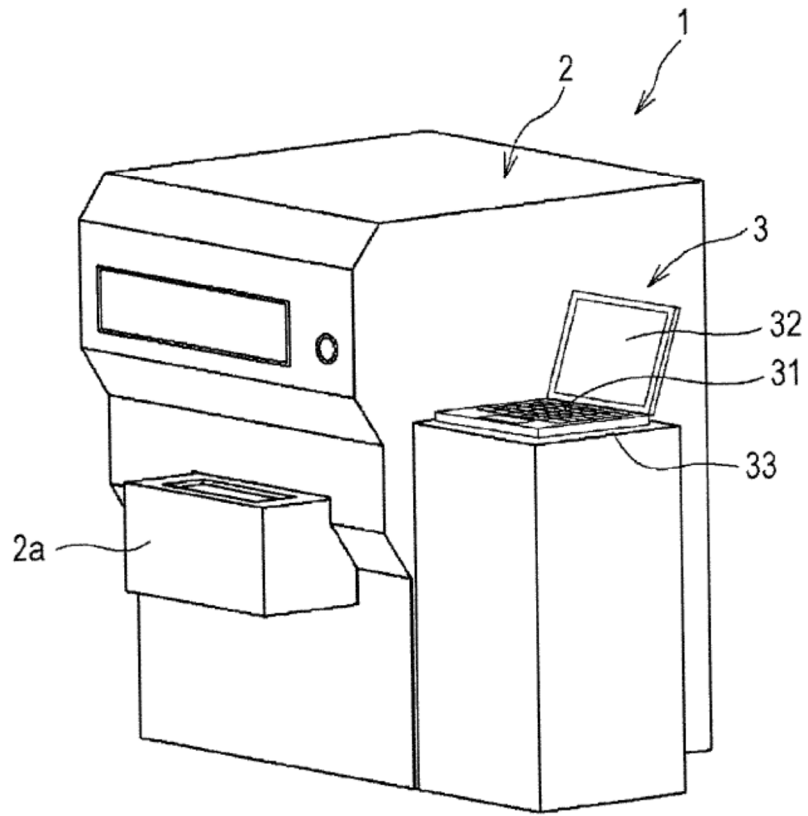
Según el ejemplo, aunque la unidad 10 de regulación de temperatura se prevé como una unidad solidaria al dispositivo 2 de medición del analizador 1 de células, la unidad 10 de regulación de temperatura también puede proveerse de manera separada del dispositivo 2 de medición como una unidad independiente.

Según la realización, la información óptica que va a obtenerse de cada célula de la muestra de medición que fluye en la célula de flujo es la señal de luz dispersada hacia adelante (FSC), la señal de luz dispersada lateral (SSC) y la señal de luz fluorescente lateral (SFL). Sin embargo, la presente invención no está necesariamente limitada a las mismas. Según la realización, por ejemplo, la señal de luz fluorescente lateral se usa para obtener el valor que representa el contenido de ADN de cada célula. Sin embargo, la señal óptica usada con ese fin no es necesariamente una señal lateral sino que puede ser una señal de luz fluorescente obtenida a un ángulo diferente (por ejemplo, señal de luz fluorescente hacia adelante). La unidad 22 de detección principal puede además proveerse con una unidad de imagen, en el que una señal de imagen de cada célula en la muestra de medición que fluye en la célula de flujo se obtiene como la información óptica. En ese caso, la unidad de imagen tiene, por ejemplo, una fuente luminosa que incluye un láser pulsado y una cámara, en la que la luz láser emitida por el láser pulsado entra en la célula 43 de flujo a través de un sistema de lentes y se transmite adicionalmente a través de una lente objetivo y un espejo dicróico, formando finalmente una imagen en la cámara. El láser pulsado emite luz mediante una temporización predeterminada que permite a la cámara capturar una imagen.

REIVINDICACIONES

1. Método para analizar una célula que comprende:
- 5 regular una temperatura de un medio que comprende alcohol, en el que la célula se fija por el medio;
teñir ADN de la célula fijada con alcohol con una solución de tinción fluorescente que contiene un colorante;
10 hacer fluir la célula al interior de un citómetro de flujo; y
obtener una información de luz fluorescente irradiando luz de una fuente luminosa del citómetro de flujo sobre la célula,
15 el método se caracteriza porque la temperatura del medio se regula de 35°C a 45°C.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además:
- 20 preparar una muestra de medición sustituyendo el medio con un diluyente antes de la etapa de obtención de información de luz fluorescente.
3. Método según la reivindicación 1, que comprende además:
- 25 obtener una información de célula basándose en la información de luz fluorescente,
en el que la información de célula es al menos una seleccionada del grupo que consiste en contenido de ADN y tamaño de núcleo celular.
4. Método según la reivindicación 1, que comprende además:
- 30 obtener una información de luz dispersada irradiando luz de una fuente luminosa del citómetro de flujo sobre la célula; y
obtener una información de célula basándose en la información de luz dispersada,
35 en el que la información de célula es una información sobre cancerización de la célula.

FIG. 1



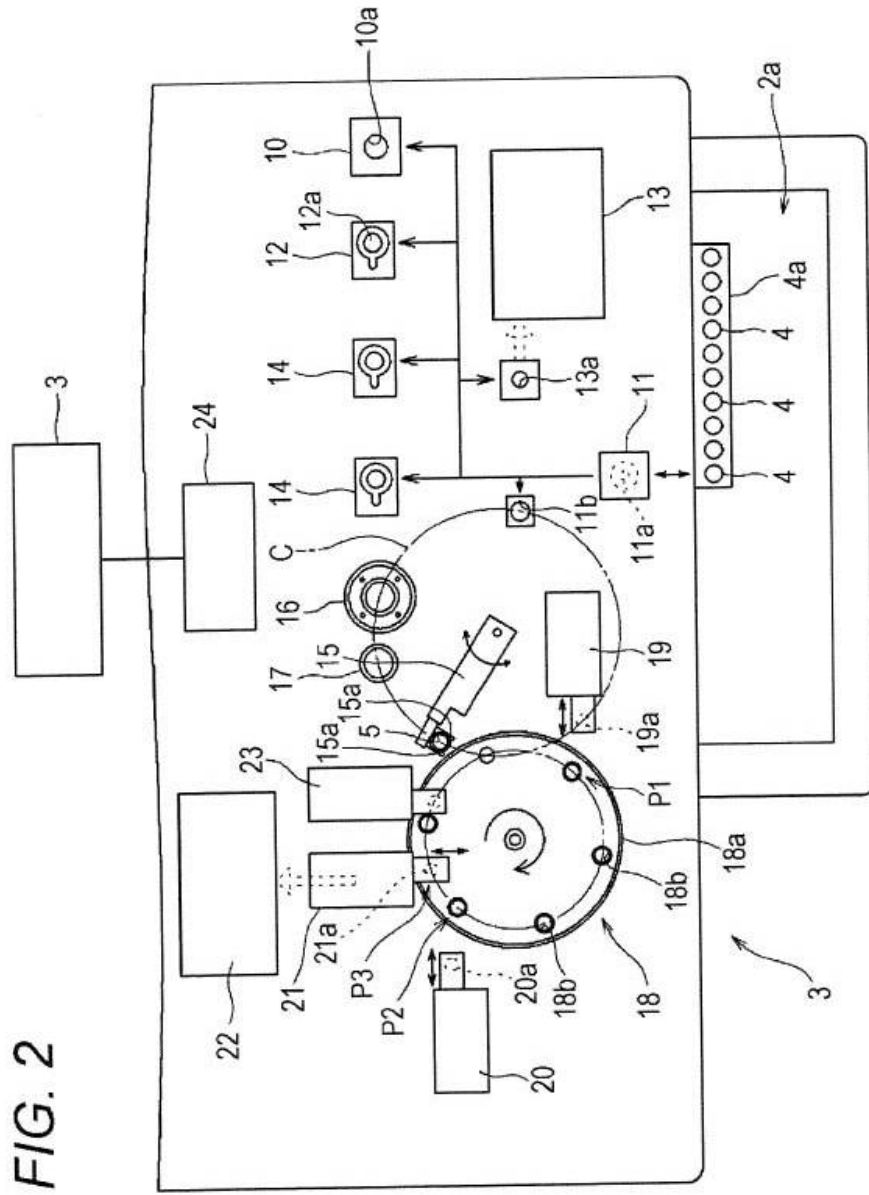


FIG. 2

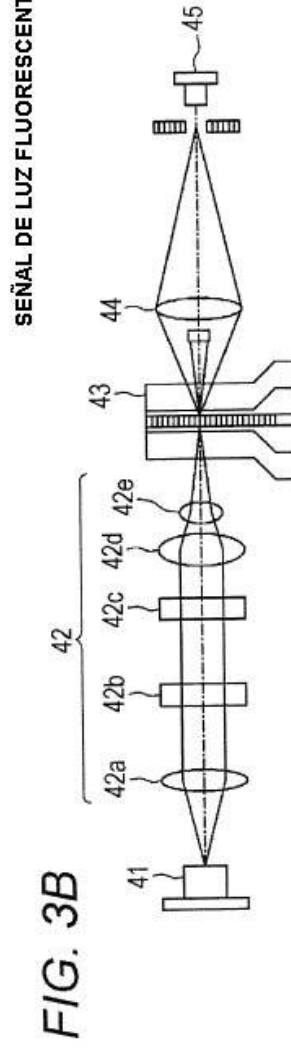
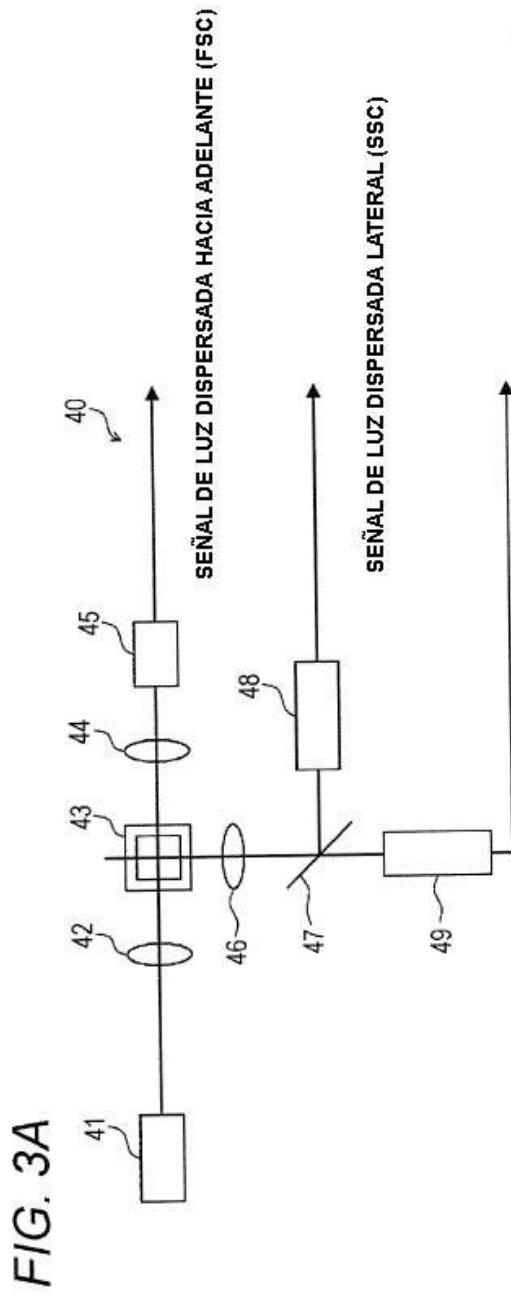


FIG. 4



FIG. 5A

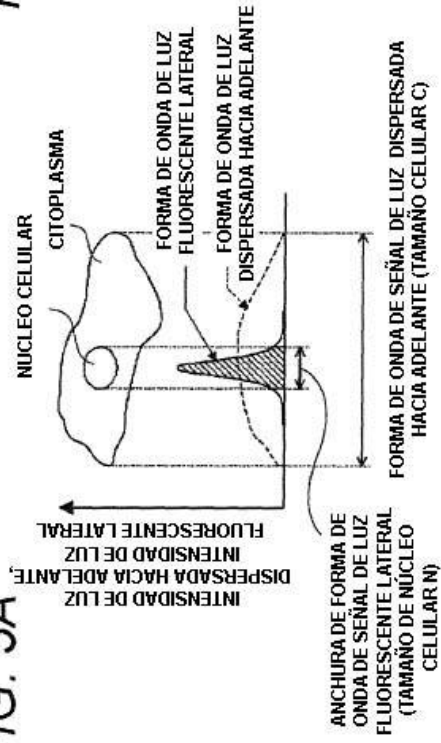


FIG. 5C

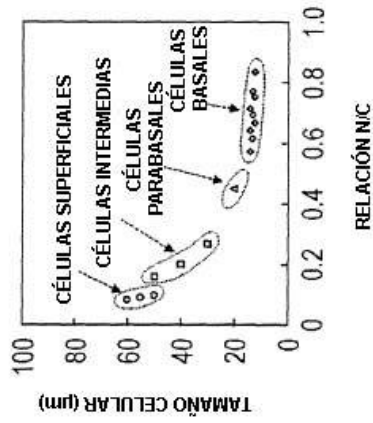


FIG. 5B

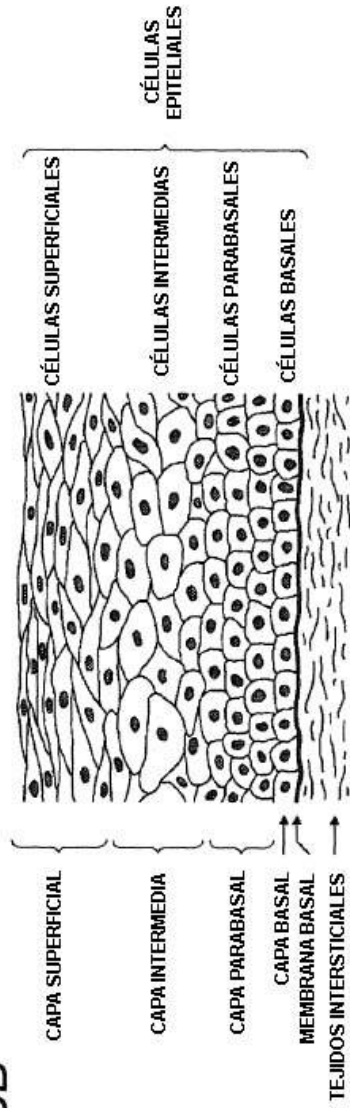


FIG. 6A

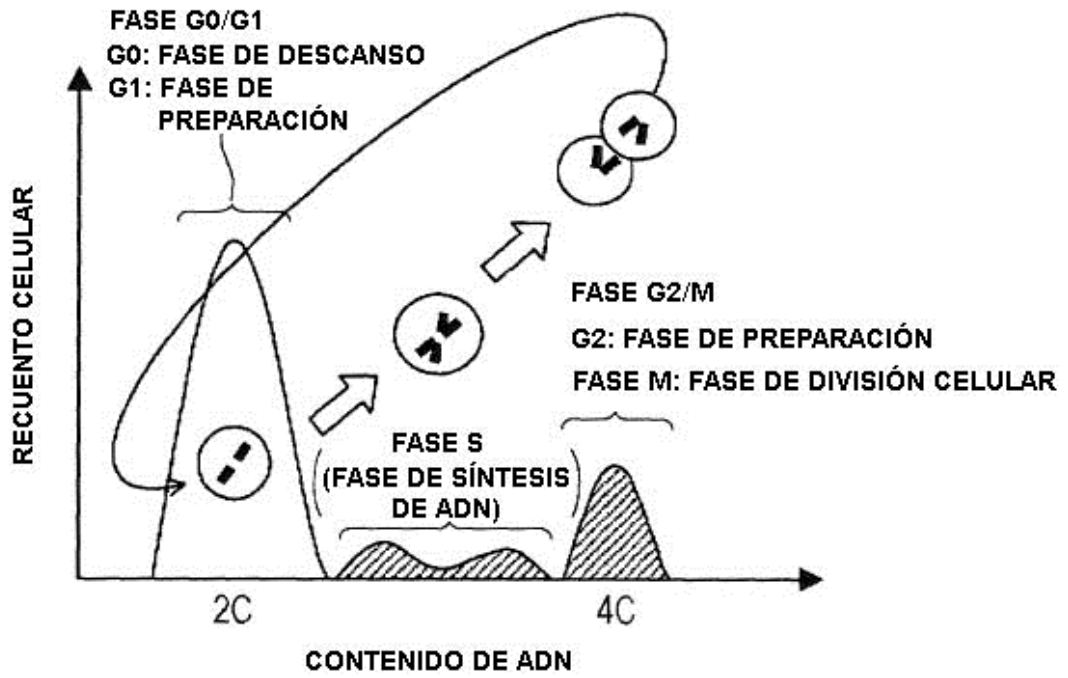


FIG. 6B

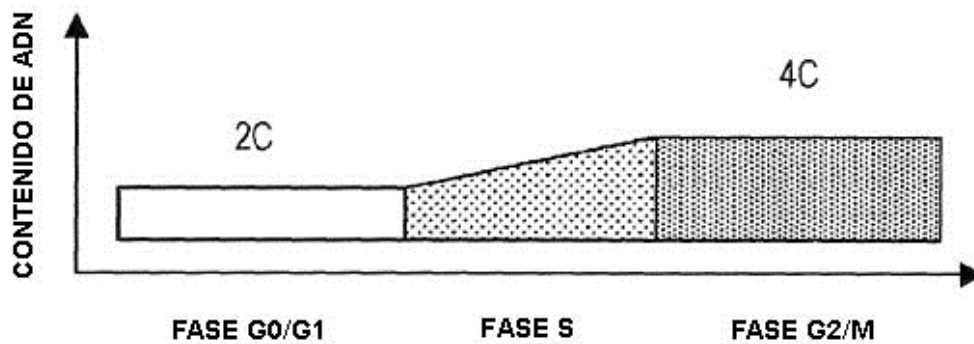


FIG. 7

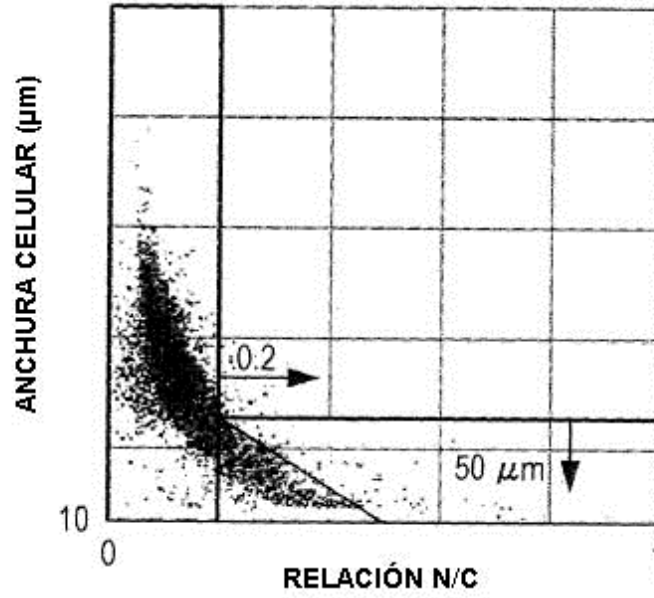


FIG. 8

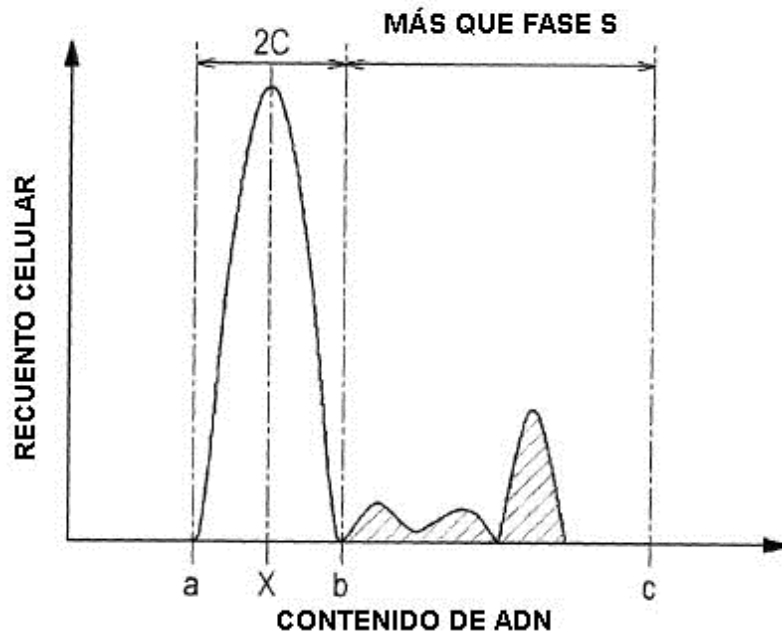
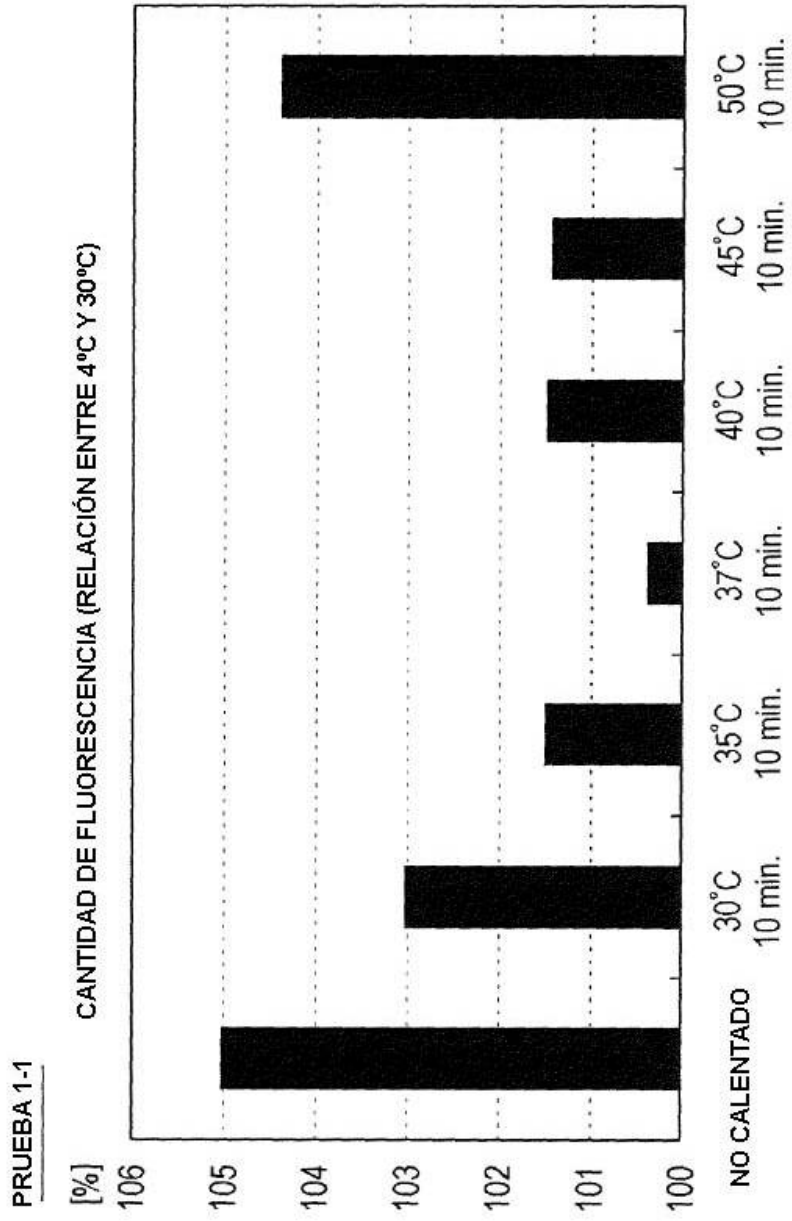


FIG. 9



MEDIO: METANOL AL 40%, ÁCIDO ACÉTICO AL 0,8%

FIG. 10

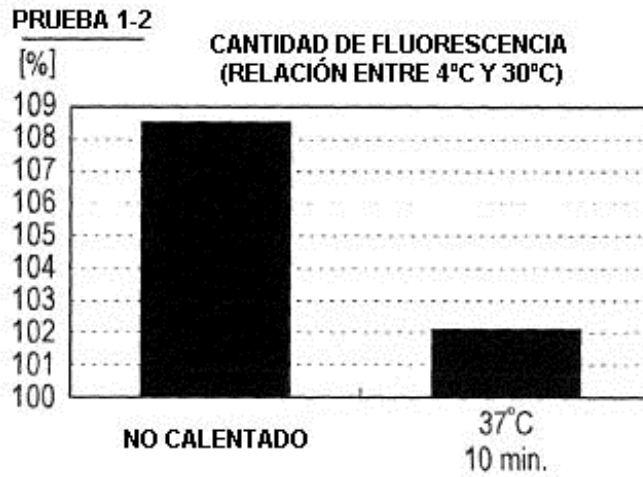


FIG. 11

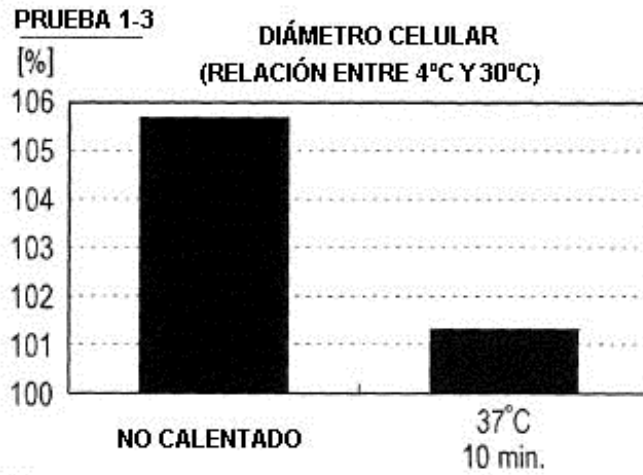


FIG. 12

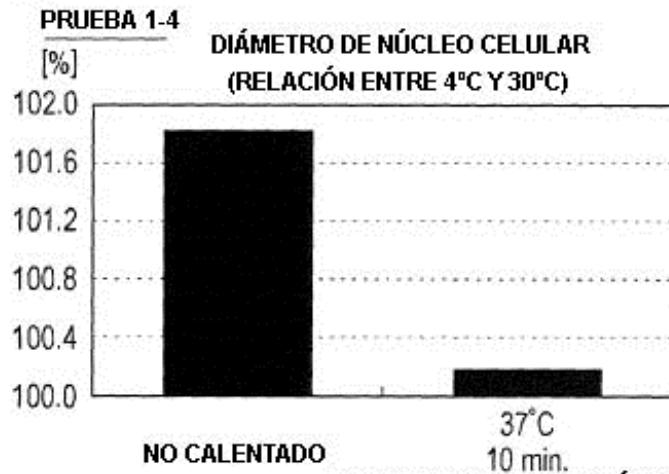
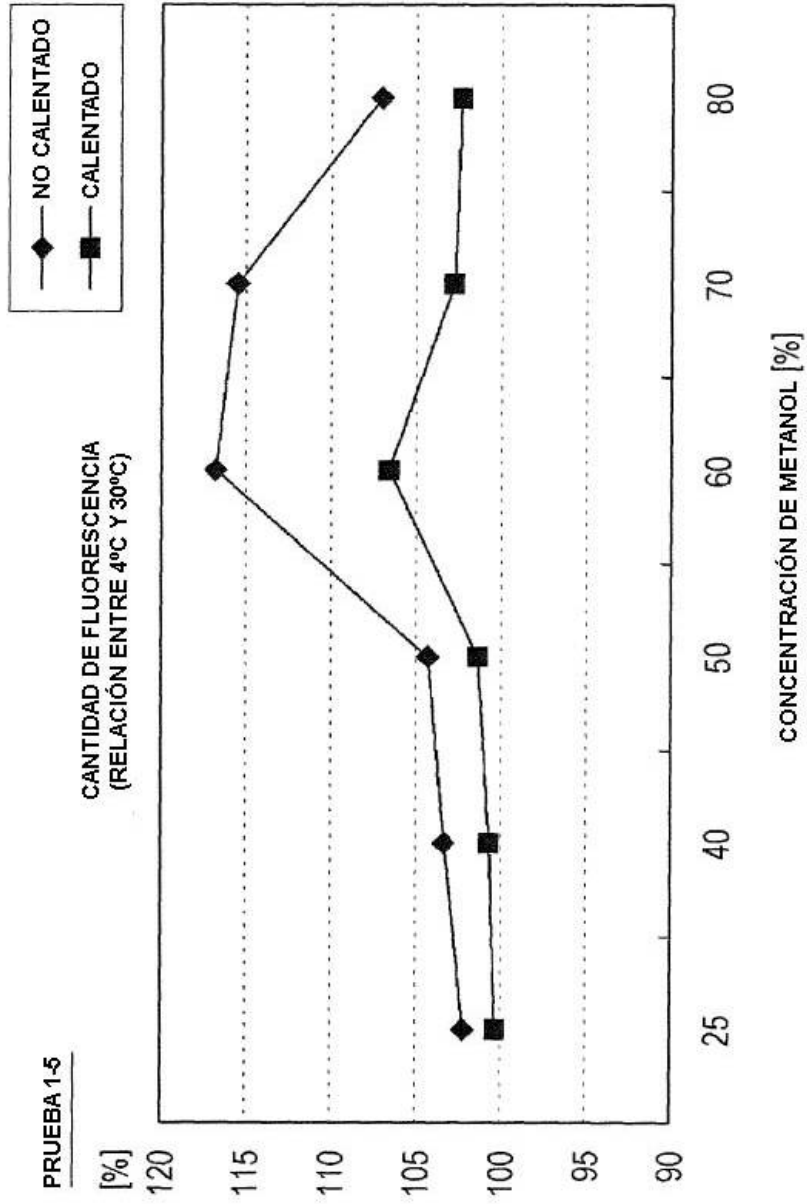
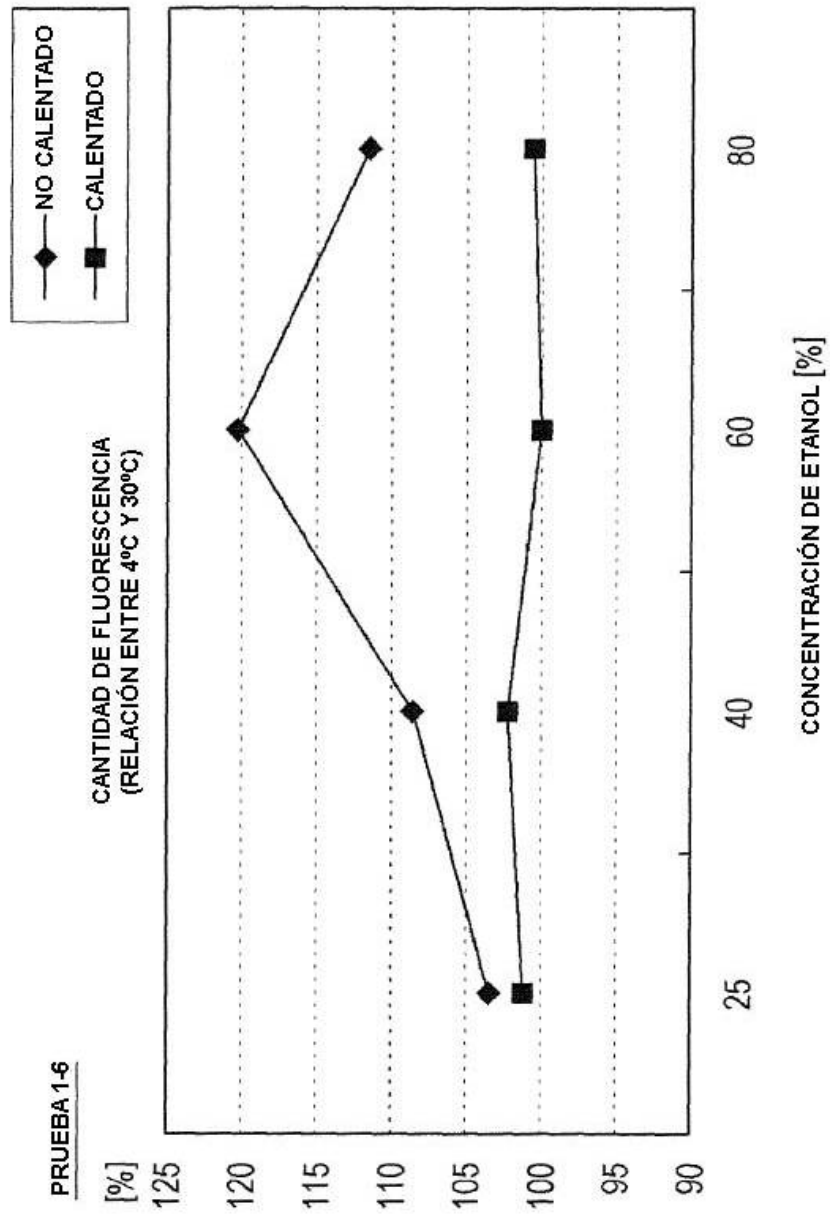


FIG. 13



MEDIO: METANOL, ÁCIDO ACÉTICO AL 0,8%

FIG. 14



MEDIO: ETANOL, ÁCIDO ACÉTICO 0,8%

FIG. 15A

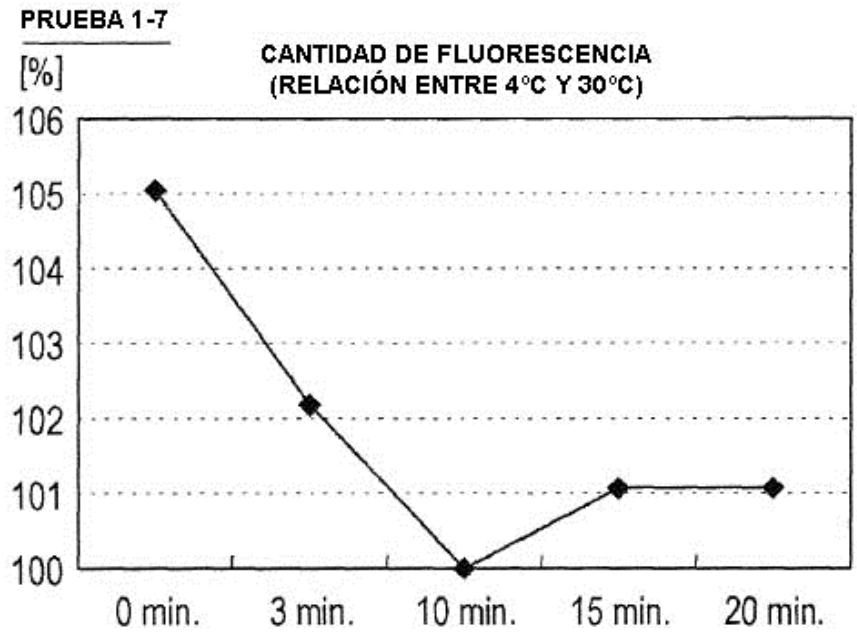


FIG. 15B

	0 min.	3 min.	10 min.	15 min.	20 min.
CONSERVADO A 4°C	5,6°C	36,3°C	36,5°C	36,5°C	36,5°C
CONSERVADO A 30°C	29,1°C	36,4°C	36,7°C	36,7°C	36,7°C

FIG. 16

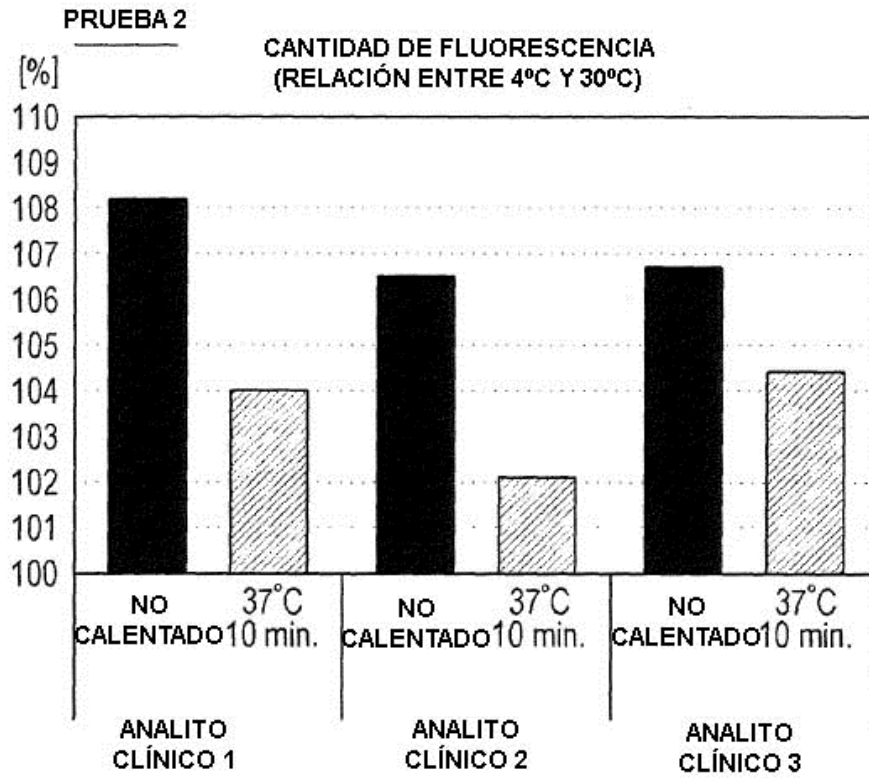


FIG. 17

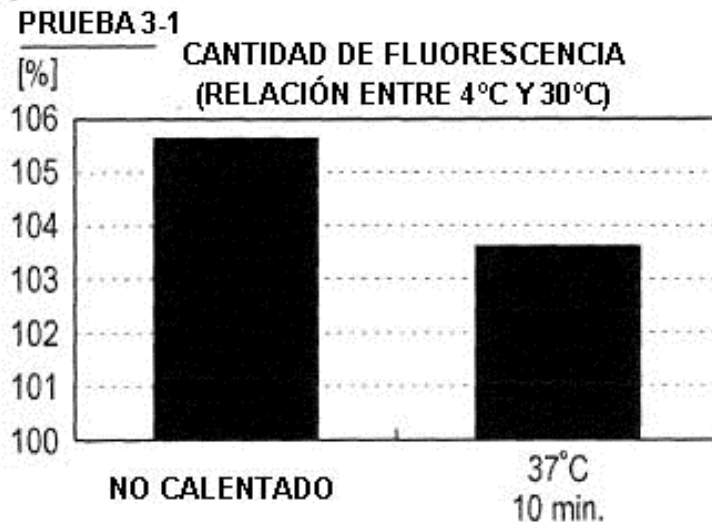


FIG. 18

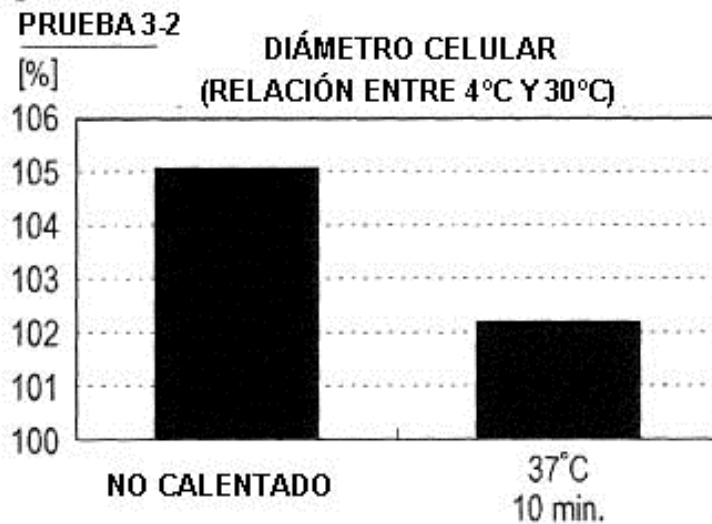


FIG. 19

