

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 218**

51 Int. Cl.:

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2010 PCT/EP2010/059324**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11000894**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2010 E 10729854 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2449377**

54 Título: **Método de detección de células tumorales por señales de fluorescencia**

30 Prioridad:

30.06.2009 EP 09164258

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

08.11.2017

73 Titular/es:

**ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS
(33.3%)**

3 Avenue Victoria

75004 Paris, FR;

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y**

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11 (33.3%)

72 Inventor/es:

FABRE, MONIQUE;

FERLICOT, SOPHIE;

FONTAINE AUPART, MARIE-PIERRE;

STEENKESTE, KARINE y

ESCHWEGE, PASCAL

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 641 218 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 detección de células tumorales por señales de fluorescencia

5 La presente invención se refiere a un método de detección de células en división o en posible división y de replicación como las células transformadas en una muestra citológica coloreada con una tinción de Papanicolaou, para la detección de señales de fluorescencia a nivel de las membranas de dichas células. Éstas presentan entonces una señal de fluorescencia diferente a la de las células normales y diferenciadas que está relacionada con su capacidad para dividirse y replicarse.

10 El estudio citológico de células tras su fijación en un portaobjetos permite caracterizar las células presentes en las muestras biológicas durante la observación con microscopio y diagnosticar la presencia de células tumorales.

15 La citología tiene dos grandes campos de aplicación: citología a gran escala, denominada de detección (por ejemplo: frotis cervico-uterino) y citología especializada en pacientes seleccionados (por ejemplo: frotis urinario, citología de órganos profundos,...). La recogida de las células se hace por extensión directa en un portaobjetos del producto celular biológico o, más recientemente, recogiendo el producto celular "en un medio líquido" para aumentar la sensibilidad diagnóstica y disponer de una reserva de células útiles que permita el uso de técnicas complementarias (inmunocitoquímica, biología molecular). Los portaobjetos de citología se colorean rutinariamente con la tinción de Papanicolaou.

20 La citología es un método particularmente interesante en clínica. Es poco costoso y ofrece información permitiendo caracterizar directamente las células de órganos potencialmente patológicos; no obstante, es limitada por el menor número de cito-técnicos y cito-patólogos formados y por la larga duración del aprendizaje necesario para el dominio de dicho método diagnóstico. En efecto, realizar una citología, que exige recursos humanos importantes, se sustituye a menudo por métodos diagnósticos histopatológicos en parafina, que resultan más invasivos para el paciente y de mayor coste para nuestro sistema de salud. Se han desarrollado nuevas técnicas semi-automatizadas de lectura de frotis cervico-uterinos en estos últimos años en el campo de la detección del cáncer de cuello.

30 Así, sería particularmente interesante disponer de un procedimiento simple y eficaz que evidenciara un fenotipo amplio y fuerte de células transformadas, asociando una observación de fluorescencia a una tinción citológica, por otra parte clásica y muy apreciada sobre fondo claro por los cito-técnicos y los cito-patólogos. La importancia de esta invención es, por ello, que proporciona una nueva potencia diagnóstica necesidad de una etapa de marcado suplementaria, de larga duración y costosa. Este procedimiento puede ser automatizado en parte, facilitando la lectura de forma que la intervención humana se limita únicamente a la verificación de áreas del portaobjetos previamente identificadas como portadoras de células patológicas.

35 La citología es un método diagnóstico sensible, principalmente para la detección de cánceres de alto grado de malignidad; sin embargo, es poco sensible para el diagnóstico de cánceres de bajo nivel de malignidad que se corresponden con un grupo de lesiones clasificadas como "modificaciones de naturaleza indeterminada", cuyo porcentaje varía en función de las células analizadas. Estos diagnósticos inciertos implican repetir la prueba citológica, por tanto volver a citar a los pacientes, con las dificultades materiales y morales que ello implica, así como un riesgo de pérdida de vista y oportunidad en ciertos territorios geográficos debido al escaso número de médicos. Para paliar estas dificultades, sería útil proporcionar un nuevo procedimiento diagnóstico simple, reproducible, estandarizado, poco costoso y que permitiera ganar tiempo al cito-patólogo.

Si se analiza la literatura referidas a las capacidades diagnósticas de la citología, se pueden observar los límites diagnósticos de las lesiones de bajo nivel de malignidad.

45 Se recuerda que:

50 Sensibilidad: probabilidad de que el diagnóstico sea positivo en los individuos afectados por la enfermedad buscada (detección de verdaderos positivos): la prueba es positiva si el paciente está afectado. La sensibilidad es baja cuando el número de falsos negativos es alto. La sensibilidad se calcula con la fórmula $SE = (\text{número de individuos afectados en que está presente la señal de enfermedad}) / (\text{número de individuos afectados en que está presente señal de enfermedad} + \text{número de individuos afectados en que no está presente la señal de enfermedad})$.

55 Especificidad: probabilidad de que el diagnóstico sea negativo en los individuos no afectados por la enfermedad buscada (no detección de verdaderos negativos): la prueba es negativa si el paciente no está afectado. La especificidad es baja cuando el número de falsos positivos es alto. La especificidad se calcula con la fórmula $SP = (\text{número de individuos no afectados en que la señal está ausente}) / (\text{número de individuos no afectados en que la señal está ausente} + \text{número de individuos no afectados en que la señal está presente})$.

5 Valor predictivo positivo: probabilidad de padecer la enfermedad si la prueba diagnóstica es positiva (es decir, el paciente no es un falso positivo); el paciente está afectado si el test es positivo. El valor predictivo positivo se calcula con la fórmula $VPP = (\text{número de individuos afectados en que está presente la señal}) / (\text{número de individuos afectados en que la señal está presente} + \text{número de individuos no afectados en que la señal está presente})$.

10 Valor predictivo negativo: probabilidad de no ser portador de la enfermedad si la prueba diagnóstica es negativa (el paciente no es un falso negativo); el paciente no está afectado si el test es negativo. El valor predictivo negativo se calcula con la fórmula $VPN = (\text{número de individuos no afectados en que la señal está ausente}) / (\text{número de individuos no afectados en que la señal está ausente} + \text{número de individuos afectados en que la señal está ausente})$.

15 La disminución de la tasa de portaobjetos que aparecen como falsos negativos (incremento del valor predictivo negativo), así como el aumento de la sensibilidad (obtenida principalmente por la disminución del número de individuos afectados en que la señal diagnóstica está ausente) son dos elementos esenciales para el desarrollo de una prueba citológica que reúna las condiciones mencionadas anteriormente y entonces puede automatizarse.

20 Idealmente, conviene en efecto que el cito-patólogo acceda (para verificar y hacer el diagnóstico definitivo) a los portaobjetos de todos los pacientes potencialmente afectados por la enfermedad a detectar (y que estos portaobjetos no sean descartados, es decir con un valor predictivo negativo del 100%), y que todos los pacientes afectados por la enfermedad respondan al diagnóstico (sensibilidad del 100%). Esto equivale al hecho de que una no-respuesta al diagnóstico implica necesariamente que el paciente no está afectado.

25 En las patologías del cuello uterino, las lesiones atípicas de Malpighi de origen indeterminado (ASC-US) o que no pueden excluir una lesión de alto nivel (ASC-H) según el sistema de Bethesda 2001 representan respectivamente del 2,3 al 5,4% y 0,6% de los casos (Quddus MR, y al. Cytojournal. 2009 6;6:15 ; Amaral RG y al. Rev Bras Ginecol Obstet. 2008; 30 (11): 556-60). La tasa de falsos negativos se estima en 6,88% y la de las lesiones atípicas de origen indeterminado en un 10,78% en una serie francesa (Labbé S, Petitjean A, Ann Pathol. 1999; 19 (5): 457-62). Si se comparan los datos de la colposcopia y los del frotis, la sensibilidad global de detección de las CIN (neoplasias intra-epiteliales) 2 y 3 se estima en un 68% (Campion MJ y al. J Exp Clin Cancer Res 1990 (Suppl): FC/107).

30 En las patologías mamarias, una punción citológica clasificada como C3 (atípica o de origen indeterminado) corresponde a un riesgo de malignidad de aproximadamente un 20% (NIH The uniform approach of breast fine needle aspiration biopsy. NIH consensus development Conference. Am. J Surg. Pathol 1997;174; 371-85).

35 En las patologías respiratorias, la sensibilidad del barrido bronquial para el diagnóstico del cáncer varía entre el 57,8 y el 71,6% (Fan YB, Cytotechnology. 2010; 62: 53-9), según la técnica utilizada. La citología pleural tiene una sensibilidad del 35%, una especificidad del 100% y un valor predictivo negativo del 82% (Davie HE y al. Am J Respir Crit Care Med. 2009; 180(5): 437-44).

40 En la patología tiroidea, la sensibilidad de la citología para el diagnóstico de cáncer se estima entre el 81 y el 96%, según la técnica utilizada (Buley ID y col. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2000; 12(3): 166-71; Cochand-Priollet B. y col. Citopathology 2003 Dec; 14(6): 343-9.

45 En la patología bilio-pancreática, los barridos de la vía biliar tienen una sensibilidad baja, del 18 al 67% (Waugh MS, y col., Diagn Cytopathol. 2008; 36(9): 651-6). En la serie de Volmar y col., que comprende 864 pacientes y se refiere a una serie de muestras citológicas bilio-pancreáticas, la sensibilidad total es del 52,6%, la especificidad del 99,4%, el valor predictivo positivo del 98,9% y el negativo sólo del 67,1% (Volmar KE y col. 2006; 108(4):231-8).

Los resultados de la citología en patología urológica son las siguientes:

	Bajo nivel	Alto nivel	Todos los niveles
Sensibilidad	26,8%	77,5%	61,9%
Especificidad	93,1%	93,1%	93,1%
Valor predictivo positivo	27,7%	69,1%	73,5%
Valor predictivo negativo	92,8%	95,5%	88,8%
Precisión de la prueba	87,2%	90,5%	85,5%
Según el Informe de la AFU: Tumores superficiales de vejiga. Gattegno B., Chopin D. Prog Urol 1:867-875, 2001.			

Considerando estos diferentes ejemplos de falta de sensibilidad para la detección de los tumores de bajo nivel de malignidad, los inventores han desarrollado un método diagnóstico innovador (Oncocell Test) que combina una tinción de Papanicolaou de las muestras citológicas con su análisis de fluorescencia. Esto

permite detectar los portaobjetos que contienen células susceptibles de replicarse o de dividirse (llevando así potencialmente a células tumorales). Un análisis complementario por imagen sobre fondo claro permite establecer un diagnóstico definitivo sobre el origen de las células observadas.

5 Este método permite detectar células que pueden replicarse. Estas células tienen una fluorescencia localizada a nivel de su membrana después de la tinción de Papanicolaou y excitación en rangos de longitud de onda específicos. Las células así fluorescentes incluyen entonces células tumorales, pero también células que no son representativas de un estado patológico, tales como células hematopoyéticas (polinucleares, macrófagos, leucocitos), células de las capas basales de diferentes epitelios (células madre, pro-genéticas),
10 células capaces de regenerarse (tales como células epiteliales, glandulares (principalmente pancreáticas) o células epiteliales transformadas por un virus (tal como BK-virus o virus del papiloma).

La tinción de Papanicolaou es un método bien conocido en citología. Fue desarrollado en 1942 (ver por ejemplo G.N.Papanicolaou, "A new procedure for staining vaginal smears", Science, vol.95, n° 2469, abril 1942, p. 438-439) para detectar cánceres cervico-uterinos y se realiza rutinariamente en los diferentes laboratorios de citología. Puede llevarse a cabo automáticamente en aparatos existentes en el mercado. Una
15 variante de este método comprende emplear secuencialmente tres colorantes:

- Hematoxilina: el producto de la oxidación de hematoxilina, la hemateína es un colorante aniónico bajo con baja afinidad para los tejidos. No obstante, la hemateína se convierte en un colorante de alta afinidad por los núcleos cuando se combina con elementos metálicos, tal como aluminio. Se puede utilizar hematoxilina de Harris o de Mayer.
- 20 - Naranja G: este producto sirve para la tinción de los citoplasmas de amarillo o naranja en caso de presencia de queratina.
- EA50: se trata de una mezcla de varios colorantes: "light green", eosina Y y "Bismarck Brown". El "light green" se utiliza para colorear el colágeno. Puede reemplazarse por "fast green", cuya intensidad disminuye más lentamente. La eosina Y sirve para colorear el citoplasma. El "Brun Bismark" no siempre está presente en el IEA50 porque reduce la duración de conservación. Colorea las mucinas ácidas.

Las muestras se enjuagan y deshidratan con alcohol después de cada tinción.

Se pueden colorear las células con hematoxilina de dos maneras diferentes: mediante la tinción progresiva, la reacción se detiene una vez se ha alcanzado la tinción deseada. También se puede colorear por tinción
30 regresiva, donde se satura la muestra y se decolora con una disolución diluida acuosa o alcohólica de ácido clorhídrico hasta la tinción deseada.

Este método está ampliamente documentado en la literatura y es conocido por el experto en la materia.

Los inventores observaron que las células capaces de replicarse coloreadas con la tinción de Papanicolaou presentan una fluorescencia inducida por excitación a una longitud de onda inferior a 520 nm, y principalmente comprendida entre 420 y 510 nm. Dicha fluorescencia está localizada al nivel de la membrana de dichas células y se observa entre 520 y 650 nm. Karine Steenkeste y col.: "Ex Vivo Fluorescence Imaging of Normal and Malignant Urothelial Cells to Enhance Early Diagnosis", Photochemistry and Photobiology, vol. 83, n° 5, septiembre 2007, p. 1157-1166, describen la detección de células cancerosas en muestras de citología urinaria después de una tinción de Papanicolaou que utiliza hematoxilina, OG6 (Orange G-6) y
40 EA50, seguida de la observación de fluorescencia peri-membranosa.

La invención se refiere a un método de detección de células capaces de replicarse en una muestra citológica de células, siendo dicha muestra no ginecológica, que comprende la preparación y la tinción con tinción de Papanicolaou, la excitación de dicha muestra con una longitud de onda inferior a 520 nm y la observación de la fluorescencia emitida por dicha muestra a una longitud de onda superior a 520 nm, presentando dichas células capaces de replicarse una acumulación de fluorescencia localizada al nivel de su envoltura
45 membranosa, caracterizado porque dicha tinción de Papanicolaou comprende las etapas sucesivas siguientes, durante las cuales la muestra se pone en contacto con:

- Agua corriente: 2 minutos
- Solución de hematoxilina: 4 minutos
- 50 - Agua corriente: 1 minuto
- Solución con una mezcla de alcohol al 100% y de HCl 0,2%: 30 segundos
- Agua corriente: 10 minutos
- Agua con amoníaco al 0,2%: 2 minutos
- Alcohol al 70%: 30 segundos
- 55 - Alcohol al 96%: 30 segundos
- Solución OG6: 4 minutos
- Alcohol al 96%: 30 segundos
- Alcohol al 96%: 30 segundos
- Solución EA50: 4 minutos

- Alcohol al 96%: 30 segundos
- Alcohol al 100%: 30 segundos
- Xileno: 30 segundos
- Xileno: 30 segundos

5 y montaje en montadora de film sobre portaobjeto en solución de xileno. La realización de este método permite separar los portaobjetos en los que no se observa ninguna fluorescencia (y que no poseen, por tanto, células capaces de replicarse, por tanto sin células tumorales). Se puede entonces precisar el origen de las células fluorescentes en los portaobjetos. El citólogo puede verificar así el origen de las células fluorescentes por transmisión clásica e identificar otras posibles señales malignas (tamaño celular, núcleo, tinción de elementos internos (cromatina), condensación o destrucción de ADN nuclear...) que dependen del origen y de la patología de la muestra considerada.

La utilización del método según la invención permite también al citólogo analizar sólo los portaobjetos susceptibles de contener células tumorales. Por otra parte, sólo le basta con observar, con transmisión clásica, las zonas que contienen células fluorescentes.

15 La realización de este método permite también reducir el tiempo necesario para cribar los portaobjetos, sin riesgo de pérdida de calidad en el diagnóstico de células tumorales, permitiendo, por el contrario, detectar más precozmente dichas células tumorales.

En el marco de la presente invención, una "muestra citológica de células" es una muestra de células que ha sido depositada en los portaobjetos citológicos según los métodos conocidos que serán citados nuevamente a continuación.

Conviene señalar que la observación bajo luz fluorescente de los portaobjetos coloreados con la tinción de Papanicolaou ya fue descrita en la técnica anterior. Así, Küpper y col. (Cytopathology, 1995, 6(5), 331-338) definen el diagnóstico de tuberculosis por *Mycobacterium kansasii* en muestras citológicas.

20 Ghali y col.. (Hum Pathol. 1984, 5(10), 907-9) señalan que *Pneumocystis carinii* presentan una fluorescencia cuando se someten las muestras coloreadas con Papanicolaou a luz infrarroja.

La fluorescencia de microorganismos en muestras coloreadas con la tinción de Papanicolaou también fue observada para *Aspergillus* (Hettlich y col., Cytopathology. 1998, 9(6), 381-8).

También se pueden detectar cristales de Charcot-Leiden sometiendo muestras coloreadas con la tinción de Papanicolaou a fluorescencia (Küpper y col., Cytopathology. 1994, 5(5), 262-9).

30 La realización del procedimiento según la invención comprende varias etapas entre la extracción desde el paciente y la observación final de los portaobjetos bajo fluorescencia (seguida eventualmente por la caracterización de las células fluorescentes mediante observación con microscopio óptico bajo luz clara).

Preparación de los portaobjetos citológicos

35 La primera etapa es la fijación de las células después de la extracción desde el paciente y su colocación en el portaobjetos citológico.

El objetivo de la etapa de fijación es mantener las células de la muestra biológica en un estado lo más próximo posible al estado fisiológico natural. En particular, se desea preservar al máximo la integridad de la membrana y de la matriz extra-celular. Conviene también preservar los detalles morfológicos de la célula, evitando una activación de las enzimas extra-celulares y de las proteínas de coagulación.

40 Así, preferentemente se realiza una fijación química sumergiendo la extracción en un líquido que contiene un agente fijador.

Numerosos agentes fijadores con estas propiedades son conocidos en la técnica. Se pueden señalar los agentes basados en formaldehído, particularmente adaptados para la etapa de fijación de células en portaobjetos citológicos. Estos agentes fijadores basados en formaldehído pueden estar tamponados para tener un pH neutro. Pueden ser acuosos o alcohólicos.

Se pueden emplear también agentes a base de alcohol (metanol).

50 Se puede trabajar con muestras líquidas en que las células están conservadas en un medio tal como Cytolyt® (Hologic Inc, Bedford, MA, USA) y re-suspender las células rápidamente en un medio tal como PreservCyt® (Hologic Inc, Bedford, MA, USA). La solución Cytolyt® es una solución de conservación tamponada a basada en metanol creada para lizar hematíes, evitar la precipitación de proteínas, disolver el mucus y preservar la morfología de las muestras citológicas normales. Constituye un medio de transporte y se utiliza en la preparación de una muestra antes de su tratamiento. No tiene por objeto la destrucción microbiana total.

Tal como se mencionó anteriormente, esta etapa de fijación química de las células permite mantener al máximo las células de la extracción en un estado lo más parecido al estado fisiológico y optimiza así la realización del método según la invención.

5 Así, es preferible que esta etapa de fijación de la muestra celular se realice lo más rápidamente posible (y preferentemente en forma inmediata) tras la extracción biológica. En todos los casos se prefiere que dicha muestra haya sido fijada en las 3 horas siguientes, preferentemente en la hora siguiente y más preferentemente 20 minutos o menos y de forma especialmente preferente en los 5 minutos siguientes a la extracción biológica.

10 Una vez fijada químicamente, la muestra celular se deposita y extiende en el portaobjetos. La muestra se "seca" para garantizar una buena adherencia al portaobjetos antes de la tinción. El secado puede realizarse al aire libre, en una estufa de secado, con alcohol (tal como isopropanol, etanol) o utilizando un espray fijador. En este último caso, es frecuente que el fijador contenga co-polímeros (tales como polietilenglicol), que dejan una película delgada en la muestra. Por tanto, es preferible enjuagar el portaobjetos para eliminar dicha película protectora y garantizar una tinción óptima de las células. El portaobjetos se enjuaga con agua si los

15 co-polímeros del espray son hidro-solubles o con alcohol.

Es preferible realizar esta etapa de colocación/extensión en el portaobjeto enseguida después de la fijación de la muestra.

20 Así es preferente que dicha muestra se fije en el portaobjetos en las 72 horas siguientes a la extracción biológica, preferentemente en las 48 horas siguientes a la extracción, preferentemente en las 24 horas siguientes a la extracción y de modo aún más óptimo en las 12 horas después de la extracción biológica.

No obstante, ciertos fijadores líquidos pueden permitir conservar las muestras durante un tiempo relativamente largo sin que se degraden.

25 Se entiende que el experto en la materia puede encontrar fácilmente en la técnica anterior diferentes protocolos de preparaciones de portaobjetos citológicos para las muestras de origen ORL, urinario, ginecológico, tiroideo, mamario, hematológico, de procedencia serosas (peritoneo, pleura, pericardio, meninges), bronquiales u otros. No obstante, aunque las modalidades de fijación pueden variar en función del órgano de origen de la extracción, la fijación de las células en un fijador líquido enseguida después de la extracción permite favorecer los resultados del método según la invención, tal como se indicó anteriormente.

30 Alternativamente, se puede considerar la colocación en el portaobjetos con fijación química en el portaobjetos, lo que permite mantener las células de la muestra biológica en un estado lo más próximo posible al estado fisiológico natural.

Tinción de los portaobjetos citológicos

Después de la colocación de las muestras biológicas en los portaobjetos citológicos, éstas se colorean con el método de Papanicolaou, utilizando secuencialmente los tres colorantes citados anteriormente.

35 En una forma de realización preferente, se colorean las muestras citológicas durante menos de 24 horas (de algunos minutos a algunas horas (6 a 12 horas) después de su colocación en el portaobjetos. Es preferible realizar la tinción de Papanicolaou en los 5 días siguientes a la fijación en el portaobjetos citológico y preferentemente en las 48 horas siguientes a la fijación en dicho portaobjetos citológico.

40 Así, como se indicó anteriormente, existe una gran variedad de aplicación de los diferentes colorantes según los protocolos de tinción de Papanicolaou.

No obstante, los inventores destacaron que la fluorescencia observada a nivel membranoso se debe a la localización de EA50 en este nivel. Por tanto, es preferible no saturar el portaobjetos con este colorante. Así, en la forma de realización de la invención, se colorea la muestra con IEA50 durante 4 minutos.

45 Se enjuaga la muestra después de la tinción con IEA50 una primera vez con alcohol al 96% durante 30 segundos y una segunda vez con alcohol al 100% durante 30 segundos. A continuación se aplica xileno, que permite terminar la tinción. De esta manera, en esta forma de realización, se reducen las etapas de enjuague con alcohol después de la tinción con EA50.

50 En general es preferible llevar a cabo el método de tinción de manera que los enjuagues después de cada etapa de tinción sean eficaces. Los enjuagues acuosos se realizan bajo flujo continuo. Los enjuagues alcohólicos son breves, típicamente de unos 30 segundos.

Observación de los portaobjetos citológicos

Tal como se citó anteriormente, los inventores observaron que las células capaces replicarse presentes en una muestra citológica coloreada con una tinción de Papanicolaou emiten una señal fluorescente celular cuando se las somete a una longitud de onda de excitación. Esta señal de fluorescencia es inducida mediante

una excitación con luz visible o UV cercano (longitud de onda inferior a 520 nm), con la emisión de fluorescencia recogida más allá de 520 nm.

Preferentemente, la longitud de onda de excitación está entre 420 y 510 nm, de modo preferente entre 450 y 490 nm.

- 5 Los inventores pudieron determinar que la acumulación de fluorescencia observada a nivel de la envoltura membranosa de las células en división emite en una longitud de onda centrada en 550 nm. Así, aunque es posible detectar dicha fluorescencia en una franja más amplia (520 a 620 nm), se prefiere trabajar a esta longitud de onda o detectar la fluorescencia emitida en la franja comprendida entre 540 y 560 nm.

Realización del método

- 10 La realización de este método permite también seleccionar entre una serie de portaobjetos citológicos aquellos en los cuales no se observa ninguna fluorescencia peri-membranosa (y que, por tanto, no contienen células tumorales) y aquellos en los cuales existen células que emiten fluorescencia a nivel de la membrana cito-plasmática. Dichas células necesitarán un control de la naturaleza tumoral o no de dichas células mediante un control con luz con fondo claro. El cito-patólogo puede identificar en transmisión clásica las posibles señales de malignidad (tamaño de los núcleos, hiper-cromatismo, tamaño de los nucleolos, incremento de la relación núcleo-citoplasma...), que dependen del origen de la muestra y de la patología considerada.

Teniendo en cuenta el alto Valor Predictivo Negativo del método según la invención, su realización permite al cito-patólogo estudiar sólo los portaobjetos susceptibles de contener células tumorales.

- 20 Una de las principales ventajas del método según la invención es que utiliza los portaobjetos tradicionalmente observados por los cito-patólogos, pero ofrece informaciones complementarias (fluorescencia) sin añadir dificultad particular alguna de preparación.

Así, la realización de este método permite reducir el tiempo utilizado para cribar los portaobjeto sin riesgo de pérdida de calidad en el diagnóstico y establecer, por el contrario, un diagnóstico más precoz de las células tumorales.

25 *Campo de aplicación del método*

El método aquí descrito ha sido validado principalmente para muestras de citologías urinarias, citologías ginecológicas y endometriales (frotis cervico-uterino), citologías pancreáticas y citologías mamarias.

- 30 No obstante, este método es aplicable también para otras citologías, tales como punciones de órganos superficiales (tiroides, seno, ganglio linfático), punción de órganos profundos (mediastino, ganglio linfático, médula ósea, pulmones, hígado, páncreas, vías biliares, pared digestiva, supra-renal, riñón, toda masa profunda abdominal o retro-peritoneal, glándulas salivales, recogida de células en líquidos fisiológicos (serosos, líquido pleural, líquido ascítico; orina, bilis, líquido articular, líquido céfalo-raquídeo, hematología), recogida de células por barrido (bronquítico, urinario y biliar) y recogida de células después de la inyección de suero fisiológico: citología respiratoria tal como lavado bronquio-alveolar, frotis anal, esfera ORL, citología de próstata (masaje prostático y recogida de primera orina después del masaje).

Automatización del método

Tal como se indicó anteriormente, resulta interesante poder automatizar la primera lectura de los portaobjetos citológicos para que el citólogo observe sólo los portaobjetos en que se detecta fluorescencia.

- 40 Esta automatización de las diferentes etapas del método debería permitir al cito-patólogo ganar tiempo y lograr una excelente estandarización.

Se establece entonces que el análisis de los portaobjetos se realice después de su digitalización utilizando un escáner o tras la captura de imagen con una cámara fotográfica.

- 45 De este modo, los portaobjetos se analizan en fluorescencia con diferentes ampliaciones para evidenciar señales específicas de células capaces de replicarse. Los portaobjetos escaneados y analizados permiten obtener un portaobjeto virtual grabado y clasificado para el patólogo con el fin de ganar tiempo y con mayor sensibilidad. Este escáner acoplado a una cámara está regulado de modo que puede determinar la emisión de fluorescencia a las longitudes de onda citadas anteriormente y centradas en torno a 550 nm bajo una onda de excitación comprendida entre 420 y 510 nm (preferentemente entre 450 y 490 nm).

- 50 También se pueden capturar las imágenes de los mismos portaobjetos bajo luz clara, observando entonces el cito-patólogo simultáneamente la imagen del portaobjetos bajo fluorescencia y bajo luz clara, pudiendo establecer un diagnóstico de malignidad.

Se entiende que, en todo momento, el cito-patólogo puede volver a recurrir a los portaobjetos originales para observarlos directamente con luz sobre fondo claro y controlar las masas celulares dudosas.

Programas informáticos de análisis de imágenes y de reconocimiento de zonas de interés del portaobjetos permiten al cito-patólogo contar con una ayuda para la lectura mediante la selección de los campos a estudiar.

5 Así, para la realización del método según la invención se puede utilizar un dispositivo de lectura de portaobjetos citológicos coloreados con una tinción de Papanicolaou que contiene medios de emisión de una longitud de onda de excitación en dicho portaobjetos y medios de lectura de la fluorescencia emitida por dicho portaobjetos.

10 Los medios de emisión de una longitud de onda de excitación en el portaobjetos citológico comprenden una fuente de radiación que emite en un rango de longitud de onda de 420 a 510 nm, preferentemente de 450 a 490 nm. Se puede tratar de un láser.

15 Los medios de lectura de la fluorescencia emitida por dicho portaobjetos (más precisamente por las células presentes en el mismo) comprenden un sensor que permite medir la radiación emitida por el portaobjetos después de la excitación. Este sensor puede también determinar la zona (o zonas) del portaobjetos en que tiene lugar la emisión de fluorescencia. Este sensor se regula de modo que puede determinar la emisión de fluorescencia a las longitudes de onda citadas anteriormente y centradas en torno a 550 nm.

Preferentemente, este dispositivo también comprende medios de captura de imágenes de dicho portaobjetos (o de varias zonas del mismo).

20 Estos medios de captura pueden ser una cámara fotográfica, que podrá capturar la imagen del portaobjetos (o de células del portaobjetos) que emite(n) fluorescencia después de la excitación. Igualmente, es preferente que el dispositivo permita la captura de la imagen de la misma zona bajo iluminación directa (es decir sin excitación de las muestras).

Preferentemente, estas imágenes capturadas se guardan en una memoria (presente en el aparato o en otro dispositivo), de modo que el citólogo pueda acceder a ellas mediante un medio informático. Estas imágenes se pueden imprimir.

25 Así, el citólogo podrá verificar las muestras comparando a la vez las imágenes que presentan las células fluorescentes y las imágenes que presentan la estructura de las células para determinar la presencia de células tumorales y establecer un diagnóstico. El dispositivo puede comprender medios asociados al sensor de radiación, lo que permite analizar el portaobjetos iluminado para determinar las zonas susceptibles de presentar células tumorales, principalmente en función de la fluorescencia emitida (intensidad, forma del elemento fluorescente), y que deben ser estudiadas con mayor precisión.

30 Esto permite también identificar las células que interesan (que presentan una fluorescencia periférica) del portaobjetos, sacar una foto, iluminarlas y fotografiarlas bajo luz no-fluorescente.

35 Ciertas solicitudes de patente (principalmente WO 96/041303 o WO 96/009593) describen medios útiles para determinar las zonas de interés en un portaobjetos, así como medios que permiten clasificar las muestras presentes en el portaobjetos citológico en función principalmente de la fluorescencia emitida, tal como se ha descrito. Así, es sabido que las células de origen sanguíneo tienen un diámetro inferior a las células tumorales en una cierta cantidad de muestras. Se puede entonces precisar un diámetro por debajo del cual las células que emiten fluorescencia no se consideran tumorales y no se tienen en cuenta. El dispositivo puede comprender además medios que permiten colorear los portaobjetos citológicos mediante el método de Papanicolaou. Esta tinción se puede llevar a cabo sumergiendo los portaobjetos citológicos en recipientes o utilizando esprays, tal como se describe en WO 92/19952. La automatización de la tinción del portaobjetos mediante el método de Papanicolaou no presenta dificultades técnicas. Un procedimiento automatizado de detección de células con potencial de replicación en una muestra citológica de células se caracteriza porque comprende las etapas que consisten en:

- 45 a) someter el portaobjetos que comprende dicha muestra a una longitud de onda comprendida entre 420 y 510 nm (preferentemente entre 450 y 490 nm)
- b) identificar las posibles zonas del portaobjetos en las que se emite una fluorescencia aproximada de 550 nm
- c) capturar una imagen de estas zonas bajo fluorescencia
- 50 d) capturar una imagen de estas zonas con microscopía por transmisión clásica bajo luz visible
- e) guardar las imágenes obtenidas en c) y d), de modo que las imágenes queden asociadas al portaobjetos observado

Las etapas de a) a e) pueden repetirse con un nuevo portaobjetos.

Descripción de las Figuras

55 Figura 1: la figura 1.A muestra la fluorescencia observada para células uroteliales sanas. La fluorescencia es difusa en el citoplasma de dichas células. La figura 1.B muestra la

acumulación de fluorescencia en la envoltura membranosa de células cancerosas (carcinoma urotelial).

Figura 2: células de Malpighi (sanas) con microscopía clásica y bajo fluorescencia. La fluorescencia es difusa en el citoplasma de dichas células.

- 5 Figura 3: polinucleares neutrófilos observados con microscopía clásica y bajo fluorescencia. Estas células, que tienen la capacidad de replicarse, presentan una fluorescencia acumulada en la envoltura membranosa.

Ejemplos de preparación de muestras celulares en patologías no ginecológicas

Ejemplo 1: Preparación de portaobjetos a partir de muestras de órganos profundos

- 10 a) Para las células recibidas en suspensión en CytolLyt®
La muestra se concentra por centrifugado (por ejemplo 600g durante 10 minutos), y se elimina el sobrenadante.
A continuación se enjuaga la muestra en una solución de tipo PreservCyt® (Hologic Inc). El tiempo de contacto con la solución PreservCyt es de al menos 15 min. El PreservCyt® es una solución tamponada de metanol que permite conservar las células entre 15°C y 30°C durante 6 semanas. A continuación, se pueden
15 fijar las células en el portaobjetos utilizando el autómatas ThinPrep (Hologic).
El recipiente de muestra ThinPrep se coloca en un procesador ThinPrep 2000 donde una dispersión suave desagrega la sangre, el mucus y los restos impropios al diagnóstico y mezcla las células de la muestra. Las células se recogen a continuación en un filtro creado a tal efecto y específico para extracciones no
20 ginecológicas. El procesador controla el caudal a través del filtro para evitar que las células no sean ni demasiado abundantes ni muy escasas.
Se vuelca entonces el filtro sobre el portaobjetos. Una atracción natural y una presión de aire levemente positiva permiten la adherencia de las células al portaobjetos. El resultado es una distribución igual de las células en una zona circular definida.
25 Este portaobjetos se deposita así automáticamente en una solución de fijación que contiene alcohol al 95% durante al menos 10 minutos antes de realizar la tinción. Una fina capa de células se transfiere entonces a un portaobjetos de cristal en un círculo de 20 mm de diámetro.
A continuación se puede realizar la tinción.

Ejemplo 2: Citopatología urinaria, barridos del aparato urinario

- 30 Las muestras llegan fijadas en formol: 30 ml de orina fresca para 4 ml de formol al 10% en un tubo cónico tipo 50 ml.
La técnica se realiza tal como se indica a continuación:
- el portaobjetos identificado se introduce en un Shandon Mégafunnel® (ThermoFisher)
- se depositan 2 ml de orina en el tanque del Mégafunnel®; el resto de la orina se conserva durante una
35 semana como máximo en un refrigerador.
- el Mégafunnel® se deposita en un tambor de una citocentrífugadora Thermo Electron® a una velocidad de 4 a 400 a 800 vueltas/minuto durante 10 minutos (programa 2).
- cuando se detiene el centrifugado, se recupera el portaobjetos y se fija inmediatamente con el espray o alcohol a 70°C durante un cuarto de hora.
40 A continuación, se puede realizar la tinción.

Ejemplo 3: Cito-patología biliar

- a) barrido biliar
El cepillo llega en un tubo cónico que contiene CytoLyt®
- Remover el cepillo
45 - Retirar el cepillo y ponerlo en otro tubo estéril en suero fisiológico
- Centrifugar el tubo de fondo cónico tipo FALCON a 1.500 vueltas/min durante 10 min en una centrífugadora JOUAN
- Tirar el sobrenadante en el recipiente de residuo líquido
- Agregar un poco de solución PreservCyt® en el residuo de transferencia
50 - Agitar bien y trasvasar el residuo de transferencia en su totalidad a un bote PreservCyt® de 30 ml
- Dejar en contacto mínimo 15 min, pero puede esperar varios días a temperatura ambiente
- Preparar un portaobjetos Thinprep (ver ejemplo 1)
b) Bilis

Recepción de los líquidos en estado fresco

- 55 Se preparan los portaobjetos del mismo modo que en el ejemplo 2 (citofunnel) y se pueden colorear.

Ejemplo 4: tinción de Papanicolaou

- Agua corriente: 2 minutos
- Solución de hematoxilina: 4 minutos
- Agua corriente: 1 minuto
- Solución con una mezcla de alcohol al 100% y de HCl al 0,2%: 30 segundos
- 5 - Agua corriente: 10 minutos
- Agua con amoníaco al 0,2%: 2 minutos
- Alcohol al 70%: 30 segundos
- Alcohol al 96%: 30 segundos
- Solución OG6: 4 minutos
- 10 - Alcohol al 96%: 30 segundos
- Alcohol al 96%: 30 segundos
- Solución EA50: 4 minutos
- Alcohol al 96%: 30 segundos
- Alcohol al 100%: 30 segundos
- 15 - Xileno: 30 segundos
- Xileno: 30 segundos
- Montaje sobre montadora de film en portaobjetos en solución de xileno.

Componentes	Referencia	Proveedor	Presentación
Papanicolaou solución 3b Solución policroma EA50	HX804463	Merck KGaA	Botella de 2,5 l
Papanicolaou solución 2a Naranja G en solución (OG6)	HX815072	Merck KGaA	Botella de 2,5 l
Hemalun en solución de Mayer	HX811422	Merck KGaA	Botella de 2,5 l
Merck KGaA, 64271 Darmstadt.Germany.			

Ejemplo 5: Lectura de las muestras

20 La lectura se realiza en un microscopio óptico de epifluorescencia (excitación a longitudes de onda < 520 nm; emisión de fluorescencia longitud de onda < 520 nm). Dicho microscopio se encuentra en todos los laboratorios de Anatomía y de Citología Patológicas para el trabajo rutinario.

25 La interpretación de las citologías por el patólogo se ve facilitada: el "screening" de las células tumorales se hace en un primer momento bajo epifluorescencia, siendo las características de las células en división una acumulación de fluorescencia en la envoltura membranosa. Las células estables (que no se dividen) presentan una fluorescencia difusa intra-citoplásmica. Conviene señalar que las células en división presentan también dicha fluorescencia citoplásmica, que no obstante es poco visible debido a la importancia de la fluorescencia ligada a la membrana celular.

30 Cuando se detectan células cancerosas potenciales, se puede realizar una confirmación con microscopio sobre fondo claro.

Conviene señalar que puede observarse una disminución de la señal fluorescente (fading) a medida que transcurre el tiempo de observación y con el tiempo. Se recomienda una conservación de los portaobjetos en ausencia de luz.

35 Así, este método permite detectar rápidamente células cancerosas en una muestra cuando se están en muy baja cantidad.

Ejemplo 6: resultados biológicos

Se realizó un estudio en citologías en pacientes con un carcinoma urotelial de vejiga conocido, en personas no afectadas por un cáncer o en citologías consideradas dudosas.

40 Se incluyeron 42 pacientes con carcinoma urotelial, de los cuales: 22 en grado 1 (G1), 5 en grado 2 (G2) y 15 en grado 3 (G3).

101 pacientes sin patología tumoral fueron analizados también según el mismo protocolo, así como 26 pacientes con una citología dudosa.

Resultados: la síntesis de los resultados se describe en las tablas siguientes:

Cáncer urotelial (n=42)	Citología -	Citología +	Citología dudosa
Fluorescencia -	0	0	0
Fluorescencia +	4	24	14
Reparto según	G1: 2 G2: 2 G3: 0	G1: 10 G2: 0 G3: 14	G1:10 G2: 3 G3: 1

ES 2 641 218 T3

Sensibilidad Citología: $24/42 = 57\%$ (para G1/G2 = $10/27$ (37%) G3 = $14/15$ (93%)); Sensibilidad Fluorescencia: $42/42$ (100%)

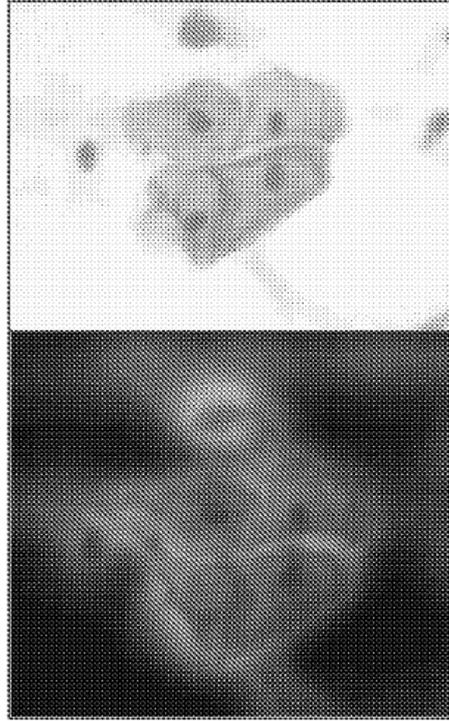
Pacientes sin cáncer (n = 101)	Citología -	Citología +	Citología dudosa
Fluorescencia -	59	1	36
Fluorescencia +	1	2	2
Sensibilidad: Citología $60/101 = 59\%$			
Sensibilidad: Fluorescencia: $96/101 = 95\%$			

5 Por otra parte, 26 citologías sospechosas fueron reevaluadas con fluorescencia: 17 pruebas de fluorescencia positivas (17 carcinomas descubiertos), 3 pruebas de fluorescencia negativas (3 cistitis), 6 pruebas de fluorescencia positivas (5 cistitis y 1 litiasis).

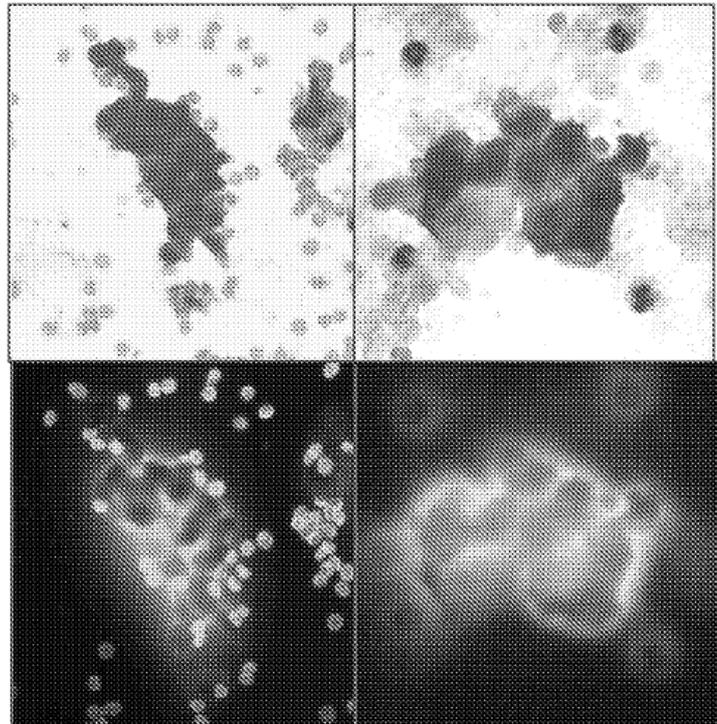
Así, el método según la invención permite mejorar el estudio citológico de muestras biológicas urinarias e incrementar la sensibilidad y el Valor Predictivo Negativo.

Reivindicaciones

1. Método de detección de células capaces de replicarse en una muestra citológica de células, siendo dicha muestra no ginecológica, que comprende la preparación y la tinción con tinción de Papanicolaou, la excitación de dicha muestra a una longitud de onda inferior a 520 nm y la observación de la fluorescencia emitida por dicha muestra a una longitud de onda superior a 520 nm, presentando dichas células capaces de replicarse una acumulación de fluorescencia localizada a nivel de su envoltura membranosa, caracterizado porque dicha tinción de Papanicolaou comprende las etapas sucesivas siguientes, en el transcurso de las cuales dicha muestra se pone en contacto con:
 - Agua corriente: 2 minutos
 - Solución de hematoxilina: 4 minutos
 - Agua corriente: 1 minuto
 - Solución con una mezcla de alcohol al 100% y de HCl al 0,2%: 30 segundos
 - Agua corriente: 10 minutos
 - Agua con amoníaco al 0,2%: 2 minutos
 - Alcohol al 70%: 30 segundos
 - Alcohol al 96%: 30 segundos
 - Solución OG6: 4 minutos
 - Alcohol al 96%: 30 segundos
 - Alcohol al 96%: 30 segundos
 - Solución EA50: 4 minutos
 - Alcohol al 96%: 30 segundos
 - Alcohol al 100%: 30 segundos
 - Xileno: 30 segundos
 - Xileno: 30 segundos
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25 y montaje en montadora de film sobre portaobjetos en solución de xileno.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la longitud de onda de excitación está entre 450 y 490 nm.
3. Método según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque se observa la fluorescencia emitida a longitudes de onda entre 540 y 560 nm.
- 30 4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la muestra se fija de modo que se mantiene la integridad de la membrana y de la matriz extracelular de las células de la muestra.
- 35 5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la fijación de las muestras se realiza con un fijador que contiene formaldehído o metanol.
6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dicha muestra se fija en las 3 horas siguientes a la extracción biológica.
- 40 7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque dicha muestra se fija durante 20 minutos o menos después de la extracción biológica.
- 45 8. Método según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque dicha muestra se selecciona de entre una muestra de citología urinaria, una muestra de citología tiroidea, una muestra de citología de glándulas salivales, una muestra de citología respiratoria, una muestra de citología serosa, una muestra de citología bilio-pancreática, una muestra de citología hematológica, una muestra de citología del sistema nervioso, una muestra de citología prostática.



A.



B.

FIGURA 1

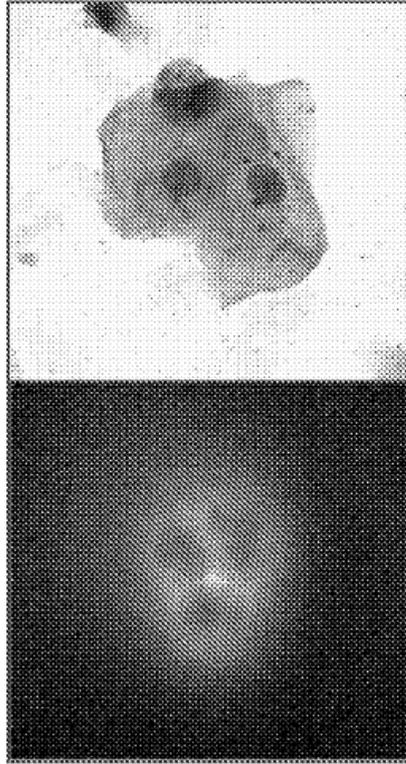


FIGURA 2

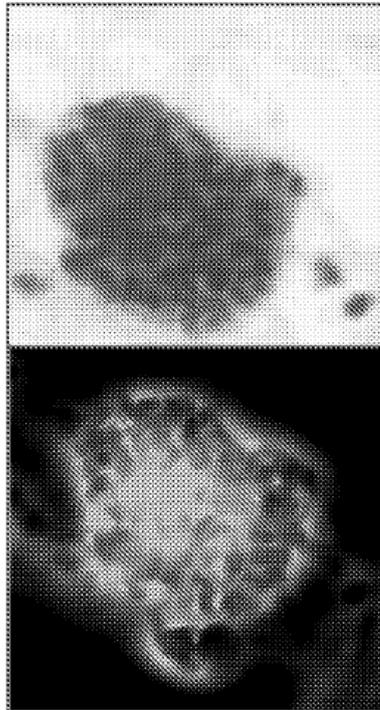


FIGURA 3