

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 728**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2006** **E 06006120 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013** **EP 1715345**

54 Título: **Un reactivo para lisar parcialmente una membrana celular de un glóbulo rojo, un reactivo para detectar glóbulos rojos infectados de malaria, y un método para analizar muestras para detectar glóbulos rojos infectados de malaria**

30 Prioridad:

29.03.2005 JP 2005094885

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

24.01.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

YOSHIDA, AYUMU;
UCHIHASHI, KINYA;
ITOSE, YUJI;
KONISHI, AYA y
IIZUKA, HIROMITSU

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 439 728 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

Un reactivo para lisar parcialmente una membrana celular de un glóbulo rojo, un reactivo para detectar glóbulos rojos infectados de malaria, y un método para analizar muestras para detectar glóbulos rojos infectados de malaria

Campo de la invención

La presente invención se refiere un reactivo para lisar parcialmente una membrana celular de un glóbulo rojo, un reactivo para detectar glóbulos rojos infectados de malaria, y un método para analizar muestras para detectar glóbulos rojos infectados de malaria.

Antecedentes

La malaria es una infección parasitaria de amplia distribución en la zona subtropical. Su agente patógeno es un parásito de la malaria clasificado como apicomplexa y es transmitida por un mosquito anopheles.

La malaria se clasifica en 4 tipos, es decir, la malaria tropical, la malaria terciana, la malaria cuartana y la malaria ovale, entre las que la malaria tropical es particularmente maligna, y salvo que se inicie su terapia dentro de unas pocas horas después de la aparición, la malaria tropical está acompañada de síntomas graves y complicaciones, dando como resultado con frecuencia la muerte. Las otras malaras, por otro lado, no son tan graves y rara vez conducen a la muerte.

Por lo tanto, la malaria tropical y las otras malaras son considerablemente diferentes con respecto al método de tratamiento y el medicamento que tiene que ser utilizado. Los síntomas de la malaria tropical empeoran rápidamente, lo que hace necesario un tratamiento inmediato, y desde el punto del salvamento de un paciente, hay casos en que la administración del medicamento se inicia cuando se sospecha que el paciente tiene la malaria tropical antes de que se haya establecido el diagnóstico final. Por consiguiente, existe la posibilidad de un diagnóstico erróneo y del efecto secundario de la medicina administrada. Otras malaras no requieren tal tratamiento inmediato y por lo tanto pueden ser tratadas consumiendo mucho tiempo.

En la fase de diagnóstico clínico, por lo tanto, es muy importante discriminar la malaria tropical a partir de las otras malaras y determinar de ese modo rápidamente con precisión un método terapéutico adecuado. En consecuencia, es importante el diagnóstico precoz de la malaria, particularmente de la malaria tropical.

En el tratamiento de la malaria tropical, el tipo de medicamento que se administra, la cantidad de medicamento que se administra y la duración de la administración son juzgados empíricamente y determinados por un médico, sobre la base de la razón de infección (razón del número de glóbulos rojos infectados de malaria con respecto al número de glóbulos rojos totales contenidos en la sangre de un volumen predeterminado). Considerando el tratamiento de la malaria tropical, por lo tanto, es necesario discriminar la malaria tropical de las otras malaras, y también es importante conocer la razón de la infección de malaria en la sangre del paciente.

Como método convencional que se utiliza en la detección de la malaria, existe un método que comprende preparar un frotis de sangre recogida de un objeto predeterminado, someterlo a tinción de Giemsa y observarlo a microscopio para detectar glóbulos rojos infectados de malaria, o un método que comprende contar los glóbulos rojos y glóbulos rojos infectados en un campo visual específico y calcular la razón de infección.

Sin embargo, el método por observación bajo microscopio es problemático debido a la necesidad de las etapas de preparación, fijación, tinción y secado de un frotis. Adicionalmente, son necesarios conocimientos prácticos sofisticados para discriminar glóbulos rojos infectados de malaria de glóbulos rojos no infectados de malaria y juzgar si el tipo de la malaria con el que se infectaron las células es la malaria tropical u otra malaria. Además, es necesario mucho tiempo (normalmente 15 minutos o más para un paciente) para la observación bajo un microscopio.

Como método para detectar automáticamente los glóbulos rojos infectados de malaria, también se desarrolla un método que implica la tinción de los glóbulos rojos infectados de malaria con un colorante fluorescente y la detección de los glóbulos rojos infectados de la malaria con un citómetro de flujo.

Sin embargo, cuando se utiliza un colorante fluorescente de ácido nucleico como se describe en la técnica anterior mencionada en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.470.751, existe el problema de que no sólo los glóbulos rojos infectados de malaria, sino también los reticulocitos se tiñen, de modo que los dos tipos de células no pueden ser discriminados unos de otros. Se propone tinción sólo de glóbulos rojos infectados de malaria con un colorante fluorescente específico (análogo de Auramina O) a baja concentración en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.470.751 supra. En este método, sin embargo, la discriminación de los glóbulos rojos infectados de malaria de los glóbulos rojos infectados no se hace suficientemente evidente.

Por otro lado, Vianen P. H. et al. (P. H. Vianen et al., Cytometry, 14:276-280) describen un método que comprende la lisis de glóbulos rojos con un agente de lisis que contiene un agente tamponador, formaldehído y dietilenglicol, para liberar parásitos de la malaria de glóbulos rojos infectados de malaria, la tinción de los parásitos de la malaria con un colorante Hoechst 33258, y la detección de los parásitos con un citómetro de flujo. En este método, la influencia de glóbulos rojos no infectados de malaria y de los reticulocitos es insignificante, pero existe el problema de que la lisis y los procedimientos de tinción son engorrosos por requerir decenas de minutos o más.

El documento EP 1406088 describe un método para detectar un parásito de la malaria mediante el tratamiento de glóbulos rojos infectados con un primer agente hemolítico que tiene un primer tensioactivo seguido de tratamiento con un segundo agente hemolítico que tiene un segundo tensioactivo. El segundo tensioactivo tiene una actividad hemolítica más alta que el primer tensioactivo. El parásito de la malaria se libera de las células y se detecta.

El documento JP-A 11-75892 describe un método que comprende la liberación de parásitos de la malaria por hemólisis, la tinción rápida de los parásitos de la malaria específicamente con un colorante que tiñe ácido nucleico y, sin separación centrífuga, la detección de los mismos con un citómetro de flujo. Sin embargo, la discriminación entre la malaria tropical y las otras malaras se lleva a cabo generalmente mediante la observación de la forma de los parásitos de la malaria en los glóbulos rojos infectados de malaria, por lo que el método del documento JP-A 11-75892 supra en donde los glóbulos rojos se lisan puede evaluar si las células están infectadas con malaria o no, pero no puede determinar si la malaria es la malaria tropical o no.

JP-A 2004-105027 propone un método para evaluar el tipo de parásito de la malaria con un citómetro de flujo mediante la utilización de una diferencia en la cantidad de un colorante de unión a ácido nucleico entre la malaria tropical y las otras malaras. Este método es un método que comprende la lisis de glóbulos rojos en una muestra para liberar parásitos de la malaria, la detección de la intensidad de fluorescencia de los parásitos de la malaria en la muestra de medición, y la evaluación del tipo de los parásitos de la malaria sobre la base de la distribución de frecuencias de parásitos de la malaria que tiene una intensidad de fluorescencia en un intervalo predeterminado.

Sin embargo, el método de detección de parásitos de la malaria liberados por lisis de glóbulos rojos, utilizado en las referencias mencionadas anteriormente, esto es, los documentos JP-A 11-75892, JP-A 2004-105027, y P. H. Vianen et al., Cytometry, 14:276-280, no puede determinar la razón de infección precisa por el siguiente motivo.

La Fig. 1 muestra un ciclo de vida de los parásitos de la malaria en los glóbulos rojos, en donde los parásitos de la malaria al chupar la sangre un mosquito anopheles, entran en el organismo y liberan merozoitos de los hepatocitos a la sangre, para entrar en los glóbulos rojos iniciando de este modo el ciclo de vida en los glóbulos rojos. En el ciclo de vida en los glóbulos rojos, el parásito de la malaria crece en forma de anillo, trofozoito y esquizonte por este orden, y el esquizonte cuando se divide en una pluralidad de merozoitos rompe el glóbulo rojo infectado para liberar merozoitos del glóbulo rojo, y los merozoitos liberados en la sangre entran en otros glóbulos rojos y vuelven a iniciar el ciclo de vida en los glóbulos rojos. El parásito de la malaria crece mediante la repetición de este ciclo y continúa rompiendo glóbulos rojos en la sangre.

El glóbulo rojo en el que entre la forma de anillo incluye no solo un glóbulo rojo en el que entra una forma de anillo (denominada en lo sucesivo como "forma de anillo (sencilla)"), sino también un glóbulo rojo en el que entran dos o más formas de anillo (denominadas en lo sucesivo como "forma de anillo (múltiple)"). En el método de detección de parásitos liberados mediante la lisis de glóbulos rojos, sin embargo, un parásito de la malaria liberado de la forma de anillo (sencilla) y uno de los parásitos de la malaria liberados de la forma de anillo (múltiple) presentan la misma intensidad de fluorescencia y por lo tanto no puede distinguirse entre sí. Como resultado, la forma de anillo (múltiple) es considerada como una pluralidad de formas de anillo (sencillas). También se puede considerar el caso en el que un esquizonte se haya liberado de una pluralidad de glóbulos rojos justo antes de la división.

En el método convencional de la observación bajo microscopio, por otra parte, la razón de infección se calcula suponiendo que el número de glóbulos rojos infectados no se ve afectado por si existen o no las formas de anillo (múltiple) y el esquizonte está en una fase madura justo antes de la división. Por lo tanto, la razón de infección obtenida en el método que comprende la lisis de glóbulos rojos y la detección de parásitos de la malaria liberados para determinar la razón de infección sobre la base de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la cantidad total de ADN en los parásitos de la malaria no está de acuerdo con la razón de infección calculada en el método convencional de observación bajo microscopio. Particularmente en el fenómeno en el que un esquizonte justo antes de la división se divide por la influencia de la hemólisis en una pluralidad de merozoitos o en la malaria tropical, donde la proporción de un glóbulo rojo multi-infectado (es decir, un glóbulo rojo infectado con 2 o 3 parásitos) tiende a ser alta, la razón de infección no puede ser captado con precisión en el método en el que se dirige la atención a la frecuencia de parásitos liberados obtenidos mediante la lisis de glóbulos rojos. Esto significa que en el campo de la medicina, en el que se selecciona un método terapéutico y se determina sobre la base de la razón de infección calculada basándose en el método convencional de la observación bajo microscopio, se puede evaluar la malaria tropical, pero se hace difícil la selección de un método terapéutico adecuado establecido hasta ahora.

Resumen

El alcance de la presente invención se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas, y no se ve afectado en ningún grado por las declaraciones dentro de este resumen.

El objeto de la presente invención es detectar glóbulos rojos infectados de malaria en una muestra de sangre fácilmente, rápidamente y con precisión.

Un primer aspecto de la presente invención es un reactivo para lisar parcialmente una membrana celular de un glóbulo rojo infectado con un parásito de la malaria de tal manera que un parásito de la malaria sea retenido en el glóbulo rojo parcialmente lisado y el colorante fluorescente pase a través de la membrana celular lisada parcialmente, que comprende:

- un primer tensioactivo catiónico; y
- un segundo tensioactivo catiónico que es diferente del primer tensioactivo catiónico;
- en donde el reactivo tiene un pH de 5 a 7 y una presión osmótica de 200 a 300 mOsm/kg·H₂O.

Un segundo aspecto de la presente invención es un procedimiento de análisis de la muestra para detectar glóbulos rojos infectados de malaria, que comprende:

- (a) preparar una muestra de medición mediante la mezcla de una muestra con el reactivo descrito anteriormente;
- (b) medir la luz fluorescente y la luz dispersada por los glóbulos rojos en la muestra de medición preparada en la etapa (a); y
- (c) detectar los glóbulos rojos infectados de malaria basándose en la luz fluorescente y la luz dispersada medida en la etapa (b).

Un tercer aspecto de la presente invención es un procedimiento de análisis de la muestra para detectar glóbulos rojos infectados de malaria, que comprende:

- (a) mezclar una muestra de sangre con el reactivo descrito anteriormente
- (b) teñir el ADN del parásito de la malaria con el colorante fluorescente;
- (c) exponer la muestra que contiene los glóbulos rojos, a la que se han aplicado los tratamientos en las etapas (a) y (b), a la luz irradiada y obtener la información óptica; y
- (d) distinguir entre los primeros glóbulos rojos que tienen forma de anillo sencillo y/o los segundos glóbulos rojos que tienen dos o más formas de anillo basándose en la información óptica obtenida.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una ilustración de un ciclo de vida de parásitos de la malaria en los glóbulos rojos.

La Fig. 2 es un ejemplo de diagrama de dispersión obtenido mediante la detección de sangre infectada de malaria en el método de detección de esta realización.

La Fig. 3 es un diagrama de dispersión que muestra el método de cálculo de la razón de infección.

La Fig. 4 es una vista que muestra un ejemplo del citómetro de flujo utilizado en el método de detección de esta realización.

La Fig. 5 es un diagrama de dispersión de una muestra de medición obtenido utilizando el Reactivo Núm. 1.

La Fig. 6 es un diagrama de dispersión de una muestra de medición obtenido utilizando el Reactivo Núm. 2.

La Fig. 7 es un diagrama de dispersión de una muestra de medición obtenido utilizando el Reactivo Núm. 3.

La Fig. 8 es un diagrama de dispersión de una muestra de medición obtenido utilizando el Reactivo Núm. 4.

La Fig. 9 es un diagrama de dispersión de una muestra de medición obtenido utilizando el Reactivo Núm. 5.

La Fig. 10 es un diagrama de dispersión de una muestra de medición obtenido utilizando el Reactivo Núm. 11.

La Fig. 11 es un diagrama de dispersión de una muestra de medición obtenido utilizando el Reactivo Núm. 12.

La Fig. 12 es un diagrama de dispersión de una muestra de medición obtenido utilizando el Reactivo Núm. 13.

La Fig. 13 es un diagrama de dispersión de una muestra de medición obtenido utilizando el Reactivo Núm. 21.

La Fig. 14 es un diagrama de dispersión de una muestra de medición obtenido utilizando el Reactivo Núm. 22.

La Fig. 15 es un diagrama de dispersión de una muestra de medición obtenido utilizando el Reactivo Núm. 23.

La Fig. 16 es (a) una microfotografía de contraste de fase (x1000) y (b) una microfotografía de fluorescencia (x1000) de una forma anillo (sencilla) presente en la muestra en el Ejemplo 1.

La Fig. 17 es (a) una microfotografía de contraste de fase (x1000) y (b) una microfotografía de fluorescencia (x1000) de una forma de anillo (doble) presente en la muestra en el Ejemplo 1.

La Fig. 18 es un diagrama de dispersión obtenido en el Ejemplo 1.

La Fig. 19 es un diagrama de dispersión obtenido en el Ejemplo 2.

La Fig. 20 es un diagrama de dispersión obtenido en el Ejemplo 3.

La Fig. 21 es un diagrama de dispersión obtenido en el Ejemplo 4.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Las realizaciones preferidas de la presente invención se describen a continuación con referencia a los dibujos.

5 Un reactivo para lisar parcialmente una membrana celular de un glóbulo rojo infectado con un parásito de la malaria comprende: un primer tensioactivo catiónico; y un segundo tensioactivo catiónico que es diferente del primer tensioactivo catiónico; en donde el reactivo tiene un pH de 5 a 7 y una presión osmótica de 200 a 300 mOsm/kg·H₂O.

10 El primer y el segundo tensioactivos catiónicos pueden ser sales de amonio cuaternario que tienen grupos alquilo de cadena larga.

El número de carbonos del grupo alquilo del segundo tensioactivo catiónico puede ser menor que el del grupo alquilo del primer tensioactivo.

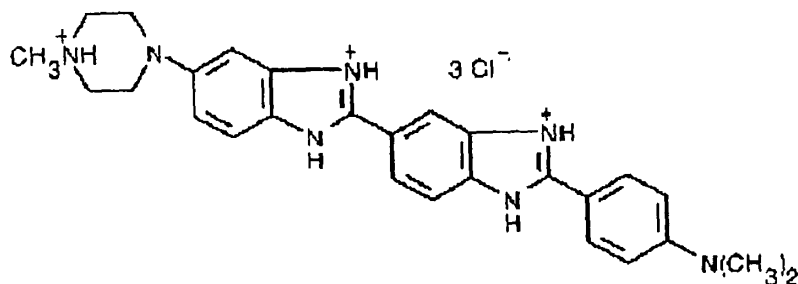
15 El primer tensioactivo catiónico puede ser cloruro de esteariltrimetilamonio, y el segundo tensioactivo catiónico puede ser cloruro de lauriltrimetilamonio.

20 El reactivo puede comprender un tensioactivo no iónico cuya dosis no tiene sustancialmente capacidad de lisis de la membrana de los glóbulos rojos.

25 El tensioactivo no iónico se puede seleccionar del grupo que consiste de monoisoestearato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, aceite de ricino hidrogenado y polioxietilenado, polioxietilenfitosterol, polioxietilenfitostanol, polioxietilenaureiléter, polioxietilenoreileter, polioxipropileno polioxietilendeciltetradecileter, polioxietilenpolioxipropilencetiléter, y monolaurato de polioxietileno.

30 Un reactivo para detectar un glóbulo rojo infectado de malaria comprende el reactivo para lisar parcialmente una membrana celular de un glóbulo rojo infectado con un parásito de la malaria, y un colorante fluorescente de tipo bisbenzimidida que tiene preferencia por el ADN sobre el ARN.

El colorante fluorescente de tipo bisbenzimidida puede tener la siguiente fórmula química.



35 Un procedimiento de análisis de la muestra para detectar glóbulos rojos infectados de malaria comprende: (a) preparar una muestra de medición mediante la mezcla de una muestra con el reactivo para detectar un glóbulo rojo infectado de malaria de, (b) medir la luz fluorescente y la luz dispersada de los glóbulos rojos en la muestra de medición preparada en la etapa (a), y (c) detectar los glóbulos rojos infectados de malaria basándose en la luz fluorescente y la luz dispersada medida en la etapa (b).

40 La etapa (b) puede comprender (d) introducir la muestra de medición en una celda de flujo; (e) exponer la muestra de medición que fluye en la celda de flujo a luz de excitación, y (f) detectar la luz fluorescente y la luz dispersada de los glóbulos rojos en la muestra de medición.

45 La etapa (c) puede comprender (g) elaborar un diagrama de dispersión basándose en la intensidad de la luz fluorescente y la intensidad de la luz dispersada, e identificar una zona de glóbulos rojos infectados de malaria para los glóbulos rojos infectados de malaria en el diagrama de dispersión.

50 La etapa (b) puede comprender (d) introducir la muestra de medición en una celda de flujo; (e) exponer la muestra de medición que fluye en la celda de flujo a luz de excitación, y (f) detectar la luz fluorescente y la luz dispersada de los glóbulos rojos en la muestra de medición.

55 La etapa (c) puede comprender (g) elaborar un diagrama de dispersión basándose en la intensidad de la luz fluorescente y la intensidad de la luz dispersada, e identificar de una zona de glóbulos rojos infectados de malaria para los glóbulos rojos infectados de malaria en el diagrama de dispersión.

La etapa (c) puede comprender detectar los primeros glóbulos rojos infectados de malaria y/o los segundos glóbulos rojos infectados de malaria basándose en la luz fluorescente y la luz dispersada, teniendo los primeros glóbulos rojos infectados de malaria forma de anillo sencillo y teniendo los segundos los glóbulos rojos infectados de malaria dos o más formas de anillo.

La etapa (c) puede comprender detectar y contar los glóbulos rojos infectados de malaria basándose en la luz fluorescente y la luz dispersada, y comprende la obtención de una razón de infección de malaria basándose en el recuento de glóbulos rojos infectados de malaria (M).

La etapa (c) puede comprender detectar y contar los glóbulos blancos basándose en la luz fluorescente y la luz dispersada, y la razón de infección de malaria se puede obtener mediante la siguiente fórmula:

$$\text{razón de infección de malaria (\%)} = K * (M * CGB) / (W * CGR) * 100$$

en donde "CGB" representa la concentración de glóbulos blancos de la muestra, "CGR" representa la concentración de glóbulos rojos de la muestra, "W" representa el recuento de glóbulos blancos, y "K" representa un número constante.

La razón de infección de malaria se puede obtener mediante la siguiente fórmula;

$$\text{razón de infección de malaria (\%)} = K * M / (CGR * V) * 100;$$

en donde "CGR" representa la concentración de glóbulos rojos de la muestra, "V" representa el volumen de la muestra utilizada para la preparación de la muestra de medición, y "K" representa un número constante.

La razón de infección de malaria se puede obtener mediante la siguiente fórmula;

$$\text{razón de infección de malaria (\%)} = M / (G + M) * 100;$$

en donde "G" representa el recuento de glóbulos rojos no infectados de malaria.

En la etapa (a), las membranas celulares de los glóbulos rojos infectados de malaria se pueden lisar parcialmente con un reactivo que comprende: un primer tensioactivo que tiene una capacidad de lisis de la membrana celular de un glóbulo rojo predeterminada, y un segundo tensioactivo que tiene una capacidad de lisis más débil que la del primer tensioactivo.

Un método de análisis de la muestra, en otra realización, para detectar glóbulos rojos infectados de malaria comprende: (a) mezclar una muestra de sangre con el reactivo para detectar un glóbulo rojo infectado de malaria; (B) teñir el ADN del parásito de la malaria con el colorante fluorescente; (c) exponer la muestra que contiene los glóbulos rojos, a la que se han aplicado los tratamientos en las etapas (a) y (b), a luz irradiada y obtener información óptica, y (d) distinguir entre los primeros glóbulos rojos que tienen forma de anillo sencillo y/o segundos glóbulos rojos que tienen dos o más formas de anillo basándose en la información óptica obtenida.

La información óptica puede comprender una primera información acerca de la luz fluorescente y una segunda información acerca de la luz dispersada que se generan mediante la exposición de la muestra a la luz irradiada.

La etapa (d) puede comprender adicionalmente (e) elaborar un diagrama de dispersión de la intensidad de la luz fluorescente y la intensidad de la luz dispersada basándose en la primera y segunda información, e identificar una primera zona de los primeros glóbulos rojos y/o una segunda zona para los segundos glóbulos rojos en el diagrama de dispersión.

La etapa (d) puede comprender adicionalmente (f) contar los primeros glóbulos rojos y los segundos glóbulos rojos.

[Reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos]

Ahora, el reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos, que se utiliza para el método de detección de glóbulos rojos infectados de malaria en esta realización, se describe en detalle.

El reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos en esta realización es un reactivo que lisa la membrana de los glóbulos rojos en un grado tal que la forma del glóbulo rojo se mantiene pero un colorante fluorescente puede penetrar en él, y el reactivo contiene un agente tensioactivo para lisar la membrana de los glóbulos rojos. El glóbulo rojo puede deformarse la medida en que el parásito de la malaria pueda ser retenido en la célula. El reactivo puede contener un tipo de tensioactivo pero preferiblemente contiene dos o más tensioactivos diferentes para la capacidad de lisar la membrana de los glóbulos rojos con el fin de alcanzar un mayor rendimiento.

El reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos en esta realización tiene preferiblemente un pH de 5,0 a 7,0 y una presión osmótica de 200 a 300 mOsm/kg.

Como tensioactivo, se utiliza un tensioactivo catiónico.

En cuanto al tensioactivo catiónico, es posible utilizar, específicamente, bromuro de octiltrimetilamonio (OTAB), bromuro de deciltrimetilamonio (DTAB), cloruro de lauriltrimetilamonio (LTAC), bromuro de miristiltrimetilamonio (MTAB), cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de esteariltrimetilamonio (STAC) etc. Una combinación de dos o más tensioactivos diferentes para la capacidad de lisar la membrana de los glóbulos rojos se selecciona preferiblemente a partir de estos tensioactivos.

La capacidad para lisar la membrana de los glóbulos rojos depende principalmente del número de átomos de carbono contenidos en el agente tensioactivo. Específicamente, a medida que aumenta el número de átomos de carbono o a medida que aumenta la cadena carbonada de un radical del grupo alquilo lineal de una sal de amonio cuaternario cuando se utiliza como un agente tensioactivo, la potencia de lisis aumenta pero el tensioactivo se solidifica fácilmente a temperaturas normales. Por lo tanto, se utiliza un tensioactivo que tiene un número menor de átomos de carbono como solubilizante que aumenta la solubilidad, en un disolvente, del reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos y regular la influencia del mismo sobre la membrana de los glóbulos rojos.

La combinación de tensioactivos y la concentración de los mismos en el reactivo puede seleccionarse de manera que mediante la combinación específica de tensioactivos, se lise la membrana de los glóbulos rojos en un grado tal que un colorante fluorescente pueda penetrar en el glóbulo rojo y simultáneamente, pueda ser mantenida la forma del glóbulo rojo. Por ejemplo, cuando se selecciona una combinación de STAC que contiene 21 átomos de carbono (el número de átomos de carbono en el grupo alquilo más largo: 18), y LTAC y que contiene 15 átomos de carbono (el número de átomos de carbono en el grupo alquilo más largo: 12), se utiliza preferiblemente una mezcla de 40 a 600 ppm de STAC y de 500 a 1400 ppm de LTAC.

Adicionalmente, se añade preferiblemente un agente tensioactivo no iónico que no lisa sustancialmente la membrana de los glóbulos rojos. Los glóbulos rojos infectados de malaria se pueden clasificar con más precisión en función de la etapa de crecimiento del parásito de la malaria.

Como tensioactivo no iónico, es preferible utilizar ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán tales como monoisoestearato polioxietilen(20)sorbitán y monooleato de polioxietilen(20)sorbitán, aceites de ricino de polioxietilenados/aceites de ricino hidrogenados tales como aceite de ricino polioxietilenado (30) e hidrogenado y aceite de ricino polioxietilenado (50) e hidrogenado, polioxietilenfitosteroles tales como polioxietilen(20)fitosterol y polioxietilen(25)fitostanol, éteres alquílicos de polioxietileno tales como polioxietilen(21)lauriléter, polioxietilen(16)oreiléter y polioxietilen(20)oreiléter, éteres alquílicos de polioxietileno y polioxipropileno tales como polioxietilen(20)polioxipropilen(6)deciltetradeciléter y polioxietilen(20)polioxipropilen(8)cetiléter, y ésteres de ácidos grasos de polioxietileno tales como monolaurato de polioxietileno (10).

El reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos en esta realización puede contener un agente tamponador para mantener un valor de pH constante. El tipo de agente tamponador no se limita en tanto que el agente tamponador pueda mantener un valor de pH adecuado para llevar a cabo la reacción de forma estable en esta realización. El valor de pH se encuentra en el intervalo de 5,0 a 7,0.

Como agente tamponador, se puede hacer uso de ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido succínico, tricina etc. Para el ajuste de pH, se pueden añadir ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o similares como agente de ajuste del pH.

Está contenido preferiblemente un agente de regulación de la presión osmótica para mantener una presión osmótica constante del reactivo. La presión osmótica es 200 a 300 mOsm/kg·H₂O. Cuando la presión osmótica es de menos de 200 mOsm/kg, los glóbulos rojos tienden a hincharse por la incorporación del reactivo o componentes líquidos de la sangre, lo que puede dar como resultado la lisis hipotónica de los glóbulos rojos. Cuando la presión osmótica es mayor de 300 mOsm/kg, un colorante fluorescente para detectar los glóbulos rojos infectados de malaria, que se va a describir más adelante, apenas penetra en un glóbulo rojo, lo que puede conducir a un cambio estructural en el glóbulo rojo por contracción.

Se utilizan preferiblemente haluros de metales alcalinos tales como cloruro de sodio, haluros de metales alcalinotérreos tales como cloruro de magnesio, carboxilatos metálicos tales como propionato, y azúcares tales como glucosa y manosa como agente de regulación de la presión osmótica.

Si fuera necesario, el reactivo puede contener conservantes tales como 2-piridiltio-1-óxido de sodio y alcohol β -fenetílico.

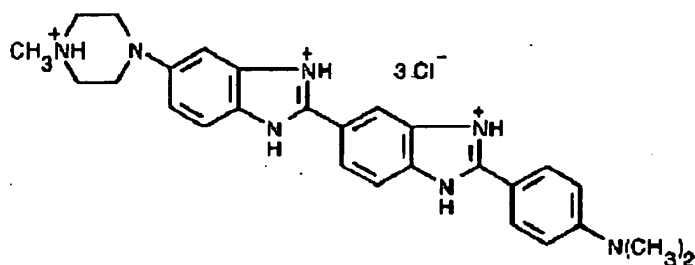
Para la regulación de la concentración, el reactivo se puede diluir con agua purificada, etanol, etc. en un intervalo tal que el pH y la presión osmótica no se vean afectados.

[Reactivo de detección]

El reactivo para detectar los glóbulos rojos infectados de malaria en esta realización comprende el reactivo mencionado anteriormente para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos en esta realización y un colorante fluorescente de selectivo de ADN, preferiblemente un colorante fluorescente tipo bisbenzimidaz selectivo de ADN.

El colorante fluorescente selectivo de ADN es un colorante fluorescente que tiñe preferentemente el ADN sobre el ARN, y el colorante fluorescente de tipo bisbenzimidaz selectivo de ADN es un colorante que tiene un esqueleto basado en una bis-imida.

En cuanto al colorante, se utiliza preferiblemente un colorante que tiene la siguiente estructura (por ejemplo, Hoechst 34580 disponible de Invitrogen Corporation).



El colorante fluorescente de tipo bisbenzimidaz selectivo de ADN incluye Hoechst 33258 y Hoechst 33342 además del colorante mencionado anteriormente. Estos colorantes son diferentes en la cadena lateral de Hoechst 34580, y pueden ser excitados en la longitud de onda azul (405 nm).

Los glóbulos rojos no tienen núcleo y por lo tanto no se tiñen con el colorante fluorescente selectivo de ADN. En un glóbulo rojo infectado de malaria, por otro lado, se tiñe el ADN en un parásito de la malaria que ha entrado en el glóbulo rojo. Por lo tanto, glóbulos rojos infectados se tiñen con el colorante fluorescente selectivo de ADN, pero los glóbulos rojos no infectados no se tiñen de manera que sobre la base de la diferencia en la intensidad de fluorescencia en un diagrama de dispersión obtenido mediante un citómetro de flujo como se describe más adelante, se pueden discriminar entre sí los dos tipos de células.

Los reticulocitos en donde queda ARN también se tiñen con el colorante fluorescente de ácido nucleico utilizado convencionalmente, permitiendo de este modo que aparezcan puntos que corresponden a los reticulocitos en una región en la que los glóbulos rojos infectados aparecen en el diagrama de dispersión, y como resultado, los reticulocitos están contenidos en la región en la que aparecen glóbulos rojos infectados. Los reticulocitos aparecen por lo general en aproximadamente 1% de los glóbulos rojos, y la razón de infección es también por lo general de aproximadamente 1%, por lo que los reticulocitos son confundidos con glóbulos rojos infectados, causando de este modo una reducción en la sensibilidad de detección y una reducción en la precisión en el cálculo de la razón de infección.

Por otra parte, el reactivo de detección en esta realización utiliza el colorante fluorescente que tiñe preferentemente el ADN sobre el ARN, permitiendo de este modo que los reticulocitos aparezcan en la región en la que aparecen glóbulos rojos normales en el diagrama de dispersión, y por lo tanto se puede prevenir la reducción en la precisión de la razón de infección atribuible a los reticulocitos.

El reactivo de detección en esta realización puede estar contenido o en un kit de reactivos de tipo de un envase que contiene el colorante fluorescente selectivo de ADN y el reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos o en un kit de reactivos de tipo de dos componentes en el que el colorante fluorescente selectivo de ADN y el reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos están contenidos en recipientes separados, respectivamente, y se mezclan para su uso. En este caso, el colorante fluorescente selectivo de ADN puede contener un alcohol tal como etilenglicol, agua purificada o un tampón como disolvente.

[Método de detección glóbulos rojos infectados por el parásito de la malaria]

El método para detectar glóbulos rojos infectados por el parásito de la malaria en esta realización comprende las etapas de mezclar una muestra de sangre completa extraída de un objeto predeterminado, con el reactivo para detectar glóbulos rojos infectados de malaria en la realización, para preparar una muestra de medición; introducir la muestra de medición en una celda de flujo de un citómetro de flujo; irradiar la muestra de medición que fluye a través de la celda de flujo con una luz de excitación que excita un colorante fluorescente contenido en el reactivo para detectar glóbulos rojos infectados de malaria; detectar una luz dispersada y la fluorescencia emitida de las células; preparar un diagrama de dispersión de la intensidad de la luz dispersada y la intensidad de fluorescencia en dos ejes; y especificar una región los glóbulos rojos no infectados de malaria y una región de glóbulos rojos infectados malaria en el diagrama de dispersión.

En primer lugar, se mezcla una muestra de sangre completa extraída de un objeto predeterminado con el reactivo descrito anteriormente para detectar glóbulos rojos infectados de malaria en la realización, para preparar una muestra de medición. La muestra de medición se prepara mezclando la muestra de sangre completa con el reactivo de detección y a continuación incubando la mezcla por lo general, por ejemplo, durante 40 segundos. Durante esta incubación, se tiñen las células que tienen ADN en la sangre. Específicamente, se tiñen los glóbulos blancos, glóbulos rojos en los que entraron los parásitos de la malaria, es decir, los glóbulos rojos infectados.

El glóbulo rojo infectado consiste en una forma de anillo, un trofozoito o un esquizonte mostrado en el ciclo de vida de parásitos de la malaria en la Fig. 1. El glóbulo rojo infectado que contiene la forma de anillo aparece en forma de anillo (sencilla) en donde un parásito de la malaria entra en un glóbulo rojo o en forma de anillo (múltiple) en donde dos o más parásitos de la malaria entran en un glóbulo rojo. Las glóbulos rojos que contienen parásitos de la malaria que tienen tales ciclo de vida en glóbulos rojos tienen una cantidad total de ADN diferente dependiendo de la etapa de crecimiento del parásito de la malaria, exhibiendo de ese modo diferente intensidad de fluorescencia en función de la etapa de crecimiento. La forma de anillo (sencilla) y la forma de anillo (múltiple) también son diferentes con respecto a la cantidad total de ADN, lo cual demuestra una intensidad de fluorescencia diferente entre sí.

Por lo tanto, la muestra de medición que contiene una muestra de sangre de la malaria tropical, se introduce en una celda de flujo, a continuación la muestra de medición que fluye a través de la celda de flujo se irradia con una luz de excitación que excita un colorante fluorescente contenido en el reactivo de detección, para detectar la luz dispersada y la fluorescencia emitida desde la muestra de medición, y se prepara un diagrama de dispersión que tiene la intensidad de la luz dispersada (ordenada) y la intensidad de fluorescencia (abscisa) como se muestra en la Fig. 2.

Como se muestra en la Fig. 2, los glóbulos rojos no infectados de malaria aparecen en una región de baja intensidad de fluorescencia, y a medida que el parásito de la malaria se convierte en una forma de anillo, trofozoito y esquizonte en este orden, los glóbulos rojos infectados de malaria aparecen en una región de intensidad de fluorescencia superior y adicionalmente en una región de mayor tamaño (intensidad de luz dispersada mayor). Con respecto a la forma de anillo, la forma de anillo (múltiple) aparece en una región de intensidad de fluorescencia mayor que la de la forma de anillo (sencilla), si bien aparecen las dos formas de anillo en una región del mismo tamaño (la misma intensidad de luz dispersada). Los glóbulos blancos aparecen en una región de mayor intensidad de la fluorescencia y una mayor intensidad de luz dispersada a causa de su tamaño y cantidad de ADN.

Para especificar las células presentes en estas regiones, el diagrama de dispersión se divide con una puerta en cada región. El que una muestra de medición esté infectada con malaria o no se puede evaluar midiéndola con un citómetro de flujo y examinando si los puntos están presentes en la región de la puerta de los glóbulos rojos infectados o no en el diagrama de dispersión de 2 dimensiones obtenido.

Cuando hay muchos puntos presentes en forma de anillo (múltiple) en la región de la puerta de los glóbulos rojos infectados, las células pueden ser evaluadas como infectadas con malaria tropical. Esto se basa en el hecho empíricamente conocido de que la malaria tropical tiende a exhibir más formas de anillo (múltiple) que en las otras malarias.

Adicionalmente, la razón de infección se puede calcular contando el número de puntos presentes en la región de la puerta de los glóbulos rojos no infectados, en la región de la puerta de los glóbulos rojos infectados en función del método de cálculo de la razón de infección como se describe más adelante, y en la región de la puerta de los glóbulos blancos.

En el método de detección de los glóbulos rojos infectados de malaria en esta realización, la detección no se basa en los parásitos de la malaria liberados mediante la lisis de glóbulos rojos infectados, y glóbulos rojos infectados que mantienen su forma se examinan como tales por medio de un citómetro de flujo, de modo que en el diagrama de dispersión resultante, se puede captar la etapa de crecimiento de la malaria. Por consiguiente, la detección no depende del estado de crecimiento o el número de parásitos con los que se infectaron las células, y cada uno de los glóbulos rojos infectados se cuenta como uno, y por lo tanto se puede determinar la razón de infección comparable con la observación al microscopio.

[Método de cálculo de la razón de infección]

La razón de infección se determina de acuerdo con cualquiera de los siguientes métodos A a C.

- 5 Método A: Método de utilización de la razón de concentración de glóbulos blancos con respecto a la concentración de glóbulos rojos

10 El Método A es un método que consiste en medir previamente la concentración de glóbulos rojos CGR y la concentración de glóbulos blancos CGB de una muestra y utilizar su razón para determinar la razón de infección sobre la base de un diagrama de dispersión preparado con un citómetro de flujo.

15 En primer lugar, una muestra objetivo se mide con un hemocitómetro (citómetro existente, por ejemplo XE-2100 fabricado por Sysmex Corporation) para determinar la concentración de glóbulos blancos CGB (células/ μ l) y la concentración de glóbulos rojos CGR (células/ μ l).

20 Los puntos en cada región celular se cuentan en el diagrama de dispersión (Fig. 3), donde cada región celular se divide con cada puerta en esta realización, para determinar el recuento de partículas de glóbulos blancos (número de puntos en la puerta W1) W y el recuento de glóbulos rojos infectados de malaria (número de puntos en la región de la puerta M1) M.

De la razón de CGB/CGR y el recuento de glóbulos blancos W determinada anteriormente, se determina el número de glóbulos rojos x contenido en la muestra de medición de acuerdo con la siguiente fórmula (1):

$$25 \quad x = (W \times \text{CGR}) / \text{CGB} \quad (1)$$

Del recuento de glóbulos rojos x y el recuento de glóbulos rojos infectados M determinado anteriormente, se calcula la razón de infección ("Razón") de acuerdo con la fórmula (2) de más abajo. En la fórmula (2), K es una constante de corrección determinada considerando la pérdida etc. en el aparato de medición.

$$30 \quad \text{Razón} = K \times M / x \times 100 \quad (2)$$

La razón de infección se puede determinar a partir de las fórmulas 1 y 2 o directamente a partir de la siguiente fórmula (3):

$$35 \quad \text{Razón} = K \times (M \times \text{CGB}) / (W \times \text{CGR}) \times 100 \quad (3)$$

40 Del mismo modo, el número de glóbulos rojos que contienen parásitos de la malaria en las etapas de crecimiento predeterminadas, es decir, el recuento de la forma de anillo (sencilla) (número de puntos en la puerta R1) R1, el recuento de la forma de anillo (múltiple) (número de puntos en la puerta R2) R2, el recuento de glóbulos rojos que contienen trofozoitos (número de puntos en la puerta T) T, y recuento de glóbulos rojos que contienen esquizontes (número de puntos en la puerta S) S se puede contar a partir del diagrama de dispersión para determinar la razón de infección en cada etapa de crecimiento en los glóbulos rojos.

Mr: porcentaje (%) de glóbulos rojos que contienen la forma de anillo en CGR infectados de malaria

$$45 \quad \mathbf{Mr} = (\mathbf{R1} + \mathbf{R2}) / \mathbf{M} \times 100$$

Mt: porcentaje (%) de glóbulos rojos que contienen trofozoítos en CGR infectados de malaria

$$50 \quad \mathbf{Mt} = \mathbf{T} / \mathbf{M} \times 100$$

Ms: porcentaje (%) de glóbulos rojos que contienen esquizontes en CGR infectados de malaria

$$\mathbf{Ms} = \mathbf{S} / \mathbf{M} \times 100$$

55 La relación Mrm (%) de la forma de anillo (múltiple) en glóbulos rojos que contienen la forma de anillo (R1 + R2) se puede calcular a partir de la siguiente fórmula (4):

$$\mathbf{Mrm} = \mathbf{R2} / (\mathbf{R1} + \mathbf{R2}) \times 100 \quad (4)$$

60 Método B: Método de cuantificación absoluta

El método B es un método en el que la concentración de glóbulos rojos CGR de una muestra se mide previamente, y a partir del volumen de la muestra utilizado en la preparación de una muestra de medición, se calcula el número de glóbulos rojos contenidos en la muestra de medición, y se determina la razón con respecto al número de glóbulos rojos infectados calculada a partir del diagrama de dispersión de la Fig. 3.

La concentración de glóbulos rojos CGR se mide de la misma manera que en el método A, y sobre la base del diagrama de dispersión en esta realización y las regiones de medición especificadas, se determina el recuento de glóbulos rojos infectados M, y a partir del volumen V (μl) de la muestra utilizada en la preparación de la muestra de medición, se determina la razón de infección Razón a partir de la siguiente ecuación (5):

$$\text{Razón} = K \times M / (\text{CGR} \times V) \times 100 \quad (5)$$

Cuando se determina la razón de infección en cada etapa de crecimiento, el número de glóbulos rojos que contienen parásitos de la malaria en las etapas de crecimiento predeterminadas, es decir, el recuento de la forma de anillo (sencilla) R1, el recuento de la forma de anillo (múltiple) R2, el recuento de glóbulos rojos que contienen trofozoitos T, y el recuento de glóbulos rojos que contienen esquizontes S se puede calcular a partir del diagrama de dispersión de la misma manera que en el Método A para determinar la razón de infección en cada etapa de crecimiento basándose en la fórmula que determina la razón de infección en cada etapa crecimiento mostrada en el Método A. La razón Mrm (%) de la forma de anillo (múltiple) en los glóbulos rojos que contienen la forma de anillo también se puede determinar de manera similar de acuerdo con la fórmula (4) anterior.

Este método es ventajoso sobre el método A en el que no se puede medir la concentración de glóbulos blancos, pero la cantidad de la muestra utilizada en la preparación de una muestra de medición se debe medir con precisión.

Método C: Método de recuento de glóbulos rojos

Método C es un método que implica contar simultáneamente glóbulos rojos no infectados y glóbulos rojos infectados en una muestra de medición y calcular la razón de infección de la misma.

A partir del diagrama de dispersión de la Fig. 3, se determinan el recuento de glóbulos rojos no infectados (número de puntos en la región de puerta GHO) G y el recuento de glóbulos rojos infectados (número de puntos en la puerta M1) M, y la razón de infección de malaria Razón se determina de acuerdo con la siguiente fórmula (6):

$$\text{Razón} = M / (G + M) \times 100 \quad (6)$$

Cuando se determina la razón de infección en cada etapa de crecimiento, los puntos en cada etapa de crecimiento se cuentan de la misma manera que en el Método A y la razón de infección se calcula de acuerdo con la fórmula en el Método A. La razón Mrm (%) de la forma de anillo (múltiple) en los glóbulos rojos que contiene la forma de anillo también se puede determinar de manera similar de acuerdo con la fórmula (4) anterior.

[Citómetro de flujo]

El citómetro de flujo utilizado en el método de detección en esta realización no está particularmente limitado, y es posible utilizar, por ejemplo, un aparato descrito en el documento JP-A 2004-10502, es decir, un aparato que incluye una celda de flujo para la introducción de una muestra de medición, y una fuente de luz para irradiar, con una luz de excitación, las células en una muestra de medición que fluye a través de la celda de flujo; un primer detector para detectar la intensidad de la luz dispersada emitida a partir de las células irradiadas con una luz de excitación; un segundo detector para detectar la intensidad de la luz de fluorescencia emitida por las células irradiadas con una luz de excitación; y una unidad de análisis para la formación de un diagrama de dispersión con la intensidad de la luz dispersada y la intensidad de fluorescencia en dos ejes, para especificar y calcular una región de glóbulos rojos no infectados de malaria y una región de glóbulos rojos infectados en el diagrama de dispersión.

La Fig. 4 es un ejemplo del sistema óptico de un citómetro de flujo utilizado en esta realización.

En la figura. 4, un haz emitido desde una fuente de luz de excitación (por ejemplo, un diodo láser azul, longitud de onda de 405 nm) 21 se utiliza para irradiar un orificio de una celda de flujo de la vaina 23 a través de una lente colimada 22. La luz dispersada en dirección delantera emitida por las células de la sangre descargadas desde la boquilla 6 y que pasan a través del orificio entra a través de una lente de recogida de luz 24 y una placa con orificios 25 en un detector de luz dispersada en dirección delantera (fotodiodo) 26. Por otra parte, la luz dispersada lateral emitida a partir de las células de la sangre que pasan a través del orificio entra a través de una lente de recogida de luz 27 y un espejo dicróico 28 a un detector de luz dispersada 29 (tubo fotomultiplicador). La fluorescencia lateral emitida por las células de la sangre que pasan a través del orificio entra a través de la lente de recogida de luz 27, el espejo dicróico 28, un filtro 29 y una placa con orificios 30 a un detector de fluorescencia lateral 31 (tubo fotomultiplicador). El señal de luz dispersada en dirección delantera emitida por el detector de luz dispersada en dirección delantera 26, la señal de luz dispersada lateral emitida desde el detector de luz dispersada lateral 29 y la

señal de fluorescencia lateral emitida desde el detector de fluorescencia lateral 31 son amplificadas por los amplificadores 32, 33 y 34, respectivamente, e introducidas en una unidad de análisis 35.

En la unidad de análisis 35, la intensidad de luz dispersada en dirección delantera y la intensidad de fluorescencia se calculan a partir de la señal de luz dispersada en dirección delantera de entrada y la señal de fluorescencia lateral respectivamente, y se prepara un diagrama de dispersión de 2 dimensiones con la intensidad de la luz dispersada en dirección delantera y la intensidad de fluorescencia como parámetros y se indica en un indicador no mostrado en la figura, y se determina el número de puntos (número de partículas) en una región arbitraria establecida en el diagrama de dispersión de 2 dimensiones y se somete a cómputo arbitrario para mostrar los resultados del recuento y los resultados aritméticos en el indicador.

Adicionalmente, el citómetro de flujo se proporciona preferiblemente con una cámara CCD y una parte de análisis de imágenes. En el método de detección en esta realización, los glóbulos rojos que mantienen su forma se examinan como tales por medio del citómetro de flujo, y de este modo se puede mostrar una imagen de los glóbulos rojos infectados y analizar para determinar la presencia de la forma de anillo (múltiple), la diferencia entre la forma de anillo (sencilla) y la forma de anillo (múltiple) y para distinguir, en la imagen, la forma de los glóbulos rojos que contiene trofozoitos y de los glóbulos rojos que contiene esquizontes.

La región de la forma del anillo (sencilla) y la región de la forma de anillo (múltiple) se especifican en las realizaciones descritas anteriormente, pero solo se puede especificar una región de forma de anillo.

Ejemplos

[Reactivo de detección]

1. Concentración de tensioactivos

Los reactivos Núms. 1 a 5 se prepararon a partir de un reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos que tiene la composición mostrada en la Tabla 1 cambiando las concentraciones de los tensioactivos como se muestra en la Tabla 2 y ajustando sus valores de pH a 6,1 con ácido clorhídrico. Se añadieron 2 µl de solución de colorante que contenía un colorante Hoechst 34580 (longitud de onda de excitación de 392 nm y longitud de onda de fluorescencia de 498 nm, fabricado por Invitrogen Corporation) disuelto en etilenglicol (0,5 mg/ml), y 1 ml de uno de los Reactivos Núms. 1 a 5, y se mezcló a 40°C durante 40 segundos con, 20 µl de la muestra a (sangre humana completa) o de la muestra b (sangre humana completa a la que se añadieron parásitos de la malaria cultivados) para preparar una muestra de medición. Esta muestra de medición se midió por medio de un citómetro de flujo utilizando un láser semiconductor azul (longitud de onda 405 nm) como fuente de luz.

Tabla 1

Tipo	Compuesto
Tensioactivo	LTAC, STAC
Agente tamponador	Ácido cítrico
Agente regulador de la presión osmótica	Cloruro de sodio
Agente de ajuste del pH	Ácido clorhídrico, hidróxido de sodio
Diluyente	Agua purificada

Tabla 2

Tensioactivo (ppm)	Reactivo Núm.				
	1	2	3	4	5
STAC	90	-	90	180	90
LTAC	-	900	900	900	2700

Los diagramas de dispersión de las muestras a y b con los Reactivos Núms. 1 a 5 se muestran en las Figs. 5 a 9, respectivamente. En cada figura, (a) es un diagrama de dispersión de la muestra a, y (b) es un diagrama de dispersión de la muestra b. En la figura, la región de la puerta GHO es una región de glóbulos rojos no infectados, la región de la puerta W1 es una región de glóbulos blancos, y M1 es una región de glóbulos rojos infectados.

Como se puede observar a partir de las Figs. 5 a 9, los glóbulos rojos infectados de malaria podrían ser detectados con un tipo de tensioactivo a baja concentración. Para la detección de los glóbulos rojos infectados de malaria en una muestra de razón de infección menor, sin embargo, el análisis con un solo tipo de tensioactivo es difícil porque una parte de los glóbulos rojos no infectados entra en la región de los glóbulos rojos infectados de malaria, por lo que dos o más tensioactivos deben mezclarse entre sí para equilibrar sus respectivas concentraciones. Por lo tanto, es preferible el Reactivo Núm. 3.

2. Reactivo - pH

Los reactivos Núms. 11 a 13 se prepararon a partir de un reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos que tiene la composición mostrada en la Tabla 1 mediante la adición de 90 ppm de STAC y 900 ppm de LTAC como tensioactivos y regulando el valor de pH como se muestra en la Tabla 3 cambiando la cantidad de ácido clorhídrico. Se añadieron 2 µl de colorante fluorescente (Hoechst 34580) utilizado en el punto 1, y 1 ml de uno de los Reactivos Núms. 11 a 13, y se mezclaron a 40°C durante 40 segundos con, 20 µl muestra a (sangre completa humana) o muestra B (sangre completa humana a la que se añadieron parásitos de la malaria en cultivo) para preparar una muestra de medición. Esta muestra de medición se midió por medio de un citómetro de flujo utilizando un láser semiconductor azul como fuente de luz.

Tabla 3

Reactivo Núm.	pH
11	3,0
12	6,0
13	8,0

Los diagramas de dispersión de las muestras a y b con los Reactivos Núms. 11 a 13 se muestran en las Figs. 10 a 12. En cada figura, (a) es un diagrama de dispersión de la muestra a y (b) es un diagrama de dispersión de la muestra b. En la figura, la región de la puerta GHO es una región de los glóbulos rojos no infectados, la región de la puerta W1 es una región de los glóbulos blancos, y M1 es una región de los glóbulos rojos infectados.

Como se puede observar a partir de la comparación entre las Figs. 10 a 12, el reactivo debe ser el Reactivo Núm. 12 con el fin de que la muestra b se distinga de la región GHO y aparezca en la región M1.

3. Presión osmótica del reactivo

La presión osmótica se midió por medio de un Osmómetro Advanced 3D3 (método crioscópico) fabricado por Advanced Instruments, Inc.

Los Reactivos Núms. 21 a 23 se prepararon a partir de un reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos que tiene la composición mostrada en la Tabla 1 (90 ppm de STAC y 900 ppm de LTAC como tensioactivos, pH 6,1) cambiando la presión osmótica como se muestra en la Tabla 4 mediante la mezcla de una cantidad diferente de cloruro de sodio. Se añadieron 2 µl de la solución de colorante que contenía Hoechst 34580 utilizado anteriormente, y 1 ml de uno de los Reactivos Núms. 21 a 23, y se mezclaron a 40°C durante 40 segundos con, 20 µl de la muestra a (sangre completa humana) o de la muestra b (sangre completa humana a la que se añadieron parásitos de la malaria en cultivo) para preparar una muestra de medición. Esta muestra de medición se midió por medio de un citómetro de flujo utilizando un láser semiconductor azul como fuente de luz.

Tabla 4

Reactivo Núm.	Presión osmótica (mOsm/kg · H ₂ O)
21	100
22	250
23	350

Los diagramas de dispersión de las muestras a y b con los Reactivos Núms. 21 a 23 se muestran en las Figs. 13 a 15. En cada figura, (a) es un diagrama de dispersión de la muestra a, y (b) es un diagrama de dispersión de la muestra b. En la figura, la región de la puerta GHO es una región de los glóbulos rojos no infectados, la región de la puerta W1 es una región de los glóbulos blancos, y M1 es una región de los glóbulos rojos infectados.

Como se puede observar a partir de la comparación entre las Figs. 13 a 15, el reactivo debe ser el reactivo Núm. 22 con el fin de que la muestra b se distinga de la región GHO y aparece en la región M1.

[Detección de glóbulos rojos multi-infectados con malaria]

Ejemplo 1

Un mililitro de reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos, que tenía la composición mostrada en la Tabla 1 (90 ppm de STAC y 900 ppm de LTAC como agentes tensioactivos, pH 6,1, presión osmótica de 256 mOsm/kg · H₂O), se mezcló con 2 µl de la solución de colorante Hoechst 34580 utilizada anteriormente, para preparar un reactivo de detección.

El reactivo de detección anterior se mezcló con una muestra que tenía 20 µl de malaria cultivada mezclada a 40°C durante 40 segundos con sangre completa humana, para preparar una muestra de medición.

Cuando esta muestra de medición se observó bajo un microscopio de contraste de fase y un microscopio de fluorescencia, se reconocieron una forma de anillo (sencilla) y una forma de anillo (múltiple) que mantenían la forma de los glóbulos rojos. Las microfotografías respectivas se muestran en las Figs. 16 y 17 respectivamente.

A continuación, esta muestra de medición se midió por medio de un citómetro de flujo utilizando un láser semiconductor azul como fuente de luz para preparar un diagrama de dispersión con la intensidad de fluorescencia en el eje de las abscisas y la intensidad de la luz dispersada en el eje de las ordenadas, y se especificó cada región, como se muestra en la Fig. 18. Los puntos en la región de la puerta R1 (forma de anillo (sencilla)) y en la región de la puerta R2 (forma de anillo (múltiple)) se contaron para determinar la razón ($R2/(R1 + R2)$) de la forma de anillo (múltiple) en los glóbulos rojos que contienen la forma de anillo.

Se preparó un frotis de la misma muestra infectada de malaria, se sometió a tinción de Giemsa y se observó bajo un microscopio. La forma de anillo (sencilla) y la forma de anillo (múltiple) se contaron dos veces respectivamente para calcular la media, para determinar la razón ($R2/(R1 + R2)$) de la forma de anillo (múltiple) en los glóbulos rojos que contienen la forma de anillo.

Los resultados del recuento basado en el diagrama de dispersión y los resultados del recuento basado en la observación al microscopio se muestran respectivamente en la Tabla 5.

Tabla 5

	Citómetro de flujo	Control visual		
		primera vez	segunda vez	media
Forma de anillo (sencilla)	6690	63	59	61
Forma de anillo (múltiple)	1532	14	15	14.5
Razón (%) de la forma de anillo (múltiple) en los glóbulos rojos que contienen la forma de anillo	18,6	19,2	20,3	19,2

Como se puede observar en la Tabla 5, la razón de la forma de anillo (múltiple) en los glóbulos rojos que contienen la forma de anillo fue de 18,6% en el método en este ejemplo y de 19,2% en el método convencional de la observación al microscopio. Se pudo confirmar que especificando y contando los puntos en la región en el método de medición en este ejemplo utilizando un citómetro de flujo, la razón de la forma de anillo (múltiple) se puede determinar con la misma precisión que contando las células a la vez que se confirma la forma por medio de la observación al microscopio.

Ejemplo 2

Un mililitro de reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos, que tenía la composición mostrada en la Tabla 6 (281 ppm de STAC y 924 ppm de LTAC como agentes tensioactivos, pH 6,1, presión osmótica de 257 mOsm/kg · H₂O), se mezcló con 2 µl de la solución de colorante Hoechst 34580 utilizada anteriormente, para preparar un reactivo de detección.

Tabla 6

Tipo	Compuesto
Tensioactivo	LTAC, STAC

Tipo	Compuesto
Agente tamponador	Ácido cítrico
Agente regulador de la presión osmótica	Cloruro de sodio
Agente de ajuste del pH	Ácido clorhídrico, hidróxido de sodio
Diluyente	Agua purificada

Como muestra de medición, se utilizó una muestra infectada de malaria terciana.

- 5 A continuación, esta muestra de medición se mezcló con el reactivo de detección anterior y se midió por medio de un citómetro de flujo utilizando un láser semiconductor azul como fuente de luz para preparar un diagrama de dispersión con la intensidad de fluorescencia en el eje de las abscisas y la intensidad de la luz dispersada en el eje de las ordenadas como se muestra en la Fig. 19. Basándose en este diagrama de dispersión, el recuento de partículas con malaria y la razón de infección de malaria se determinó mediante el Método A descrito anteriormente.
- 10 La constante K de corrección utilizada en el cálculo de la razón de infección mediante el Método A es 1. Los resultados, junto con los de control visual se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

	Recuento de partículas Malaria	Razón de infección
Control visual	-	0,28%
Ejemplo 2	8616	0,31%
Ejemplo 3	8312	0,29%
Ejemplo 4	8556	0,28%

- 15 Como se puede observar en la Tabla 7, la razón de infección por malaria fue de 0,31% en el método del Ejemplo 2 y 0,28% en el método convencional (comprobación visual) de observación al microscopio. Por lo tanto, se pudo confirmar que cuando se utiliza el método del Ejemplo 2, la razón de infección se puede determinar con la misma precisión que contando las células a la vez que se confirma la forma por medio de la observación al microscopio.

20 Ejemplo 3

- Un mililitro de reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos, que tenía la composición mostrada en la Tabla 8 (281 ppm de STAC, 924 ppm de LTAC y 500 ppm de polioxietileno(20)fitosterol como tensioactivos, pH 6,1, presión osmótica 257 mOsm/kg·H₂O), se mezcló con 2 µl de la solución de colorante Hoechst 34580 utilizada anteriormente, para preparar un reactivo de detección.

Tabla 8

Tipo	Compuesto
Tensioactivo	LTAC, STAC, polioxietileno (20) Fitosterol
Agente tamponador	Ácido cítrico
Agente regulador de la presión osmótica	Cloruro de sodio
Agente de ajuste del pH	Ácido clorhídrico, hidróxido de sodio
Diluyente	Agua purificada

- 30 Como muestra de medición, se utilizó la misma muestra infectada con malaria terciana que en el Ejemplo 2.

- A continuación, esta muestra de medición se mezcló con el reactivo de detección anterior y se midió por medio de un citómetro de flujo utilizando un láser semiconductor azul como fuente de luz, para preparar un diagrama de dispersión con la intensidad de fluorescencia en el eje de las abscisas y la intensidad de la luz dispersada en el eje de las ordenadas como se muestra en la Fig. 20. Basándose en este diagrama de dispersión, el recuento de partículas con malaria y la razón de infección de malaria se determinaron mediante el mismo método que en el Ejemplo 2. Los resultados, junto con los de control visual se muestran en la Tabla 7.

Como se puede observar en la Tabla 7, la razón de infección por malaria fue de 0,29% en el método del Ejemplo 3 y de 0,28% en el método convencional (comprobación visual) de observación al microscopio. Por lo tanto, se pudo confirmar que cuando se utiliza el método del Ejemplo 3, la razón de infección se puede determinar con la misma precisión que contando las células a la vez que se confirma la forma mediante la observación al microscopio.

También se puede confirmar que los grupos de la cada etapa de crecimiento se distinguen más claramente en el diagrama de dispersión en la Fig. 20 que por el método del Ejemplo 2 que no utiliza un agente tensioactivo no iónico en el reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos.

Ejemplo 4

Un mililitro de reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos, que tenía la composición mostrada en la Tabla 9 (281 ppm de STAC, 924 ppm de LTAC y 500 ppm de polioxietilen(25)fitoestanol como tensioactivos, pH 6,1, presión osmótica 257 mOsm/kg·H₂O), se mezcló con 2 µl de la solución de colorante Hoechst 34580 utilizada anteriormente, para preparar un reactivo de detección.

Tabla 9

Tipo	Compuesto
Tensioactivo	LTAC, STAC, Polioxietilen(25)fitoestanol
Agente tamponador	Ácido cítrico
Agente regulador de la presión osmótica	Cloruro de sodio
agente de ajuste del pH	Ácido clorhídrico, hidróxido de sodio
Diluyente	Agua purificada

Como muestra de medición, se utilizó la misma muestra infectada con malaria terciana que en los Ejemplos 2 y 3.

A continuación, esta muestra de medición se mezcló con el reactivo de detección anterior y se midió por medio de un citómetro de flujo utilizando un láser semiconductor azul como fuente de luz, para preparar un diagrama de dispersión con la intensidad de fluorescencia en el eje de las abscisas y la intensidad de la luz dispersada en el eje de las ordenadas como se muestra en la Fig. 21. Basándose en este diagrama de dispersión, el recuento de partículas con malaria y la razón de infección de malaria se determinaron mediante el mismo método que en los Ejemplos 2 y 3. Los resultados, junto con los de control visual se muestran en la Tabla 7.

Como se puede observar a partir de la Tabla 7, la razón de infección por malaria fue de 0,28% en el método del Ejemplo 4 y de 0,28% en el método convencional (comprobación visual) de observación bajo un microscopio. Por lo tanto, se pudo confirmar que cuando se utiliza el método del Ejemplo 4, la razón de infección se puede determinar con la misma precisión que contando las células a la vez que se confirma la forma por medio de la observación al microscopio.

También se puede confirmar que los grupos de la cada etapa de crecimiento se distinguen más claramente en el diagrama de dispersión en la Fig. 21 que por el método del Ejemplo 2 que no utiliza un agente tensioactivo no iónico en el reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos.

El reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos en esta realización se puede utilizar para preparar una muestra de medición con glóbulos rojos para mantener su forma, aplicable como tal a un citómetro de flujo, y por lo tanto se puede aplicar donde se desee para observar no sólo la distribución de las células basándose en la intensidad de fluorescencia sino también la forma de los glóbulos rojos.

El método de detección en esta realización se puede utilizar para conocer la razón de infección y la razón de glóbulos rojos que contienen parásitos de la malaria en una etapa de crecimiento predeterminada, rápidamente y fácilmente con una precisión comparable a la del recuento de células mientras se observa realmente la forma bajo un microscopio. Por lo tanto, se pueden evitar problemas tales como una mala reproducibilidad de los resultados y la diferencia en el límite de detección, dependiendo del conocimiento práctico de un técnico que observa una muestra bajo un microscopio. Adicionalmente, el método de detección de la realización puede prevenir el juicio subjetivo realizado por el técnico proporcionando de este modo resultados de los exámenes más objetivos. En el campo médico actual, el método de detección de la realización se puede utilizar en el diagnóstico rápido y en la selección de un método terapéutico incluyendo la determinación de la dosis de un medicamento administrado, la duración de la administración, etc.

- El método de detección de la realización también se puede utilizar en los campos de investigación como la elucidación del mecanismo de infección con parásitos de la malaria y la creación de medicamentos contra la malaria y en otros estudios que requieren la confirmación de la razón de infección y el estado de crecimiento de los parásitos de la malaria. Por ejemplo, es posible seleccionar medicamentos más eficaces mediante la clasificación de los
- 5 glóbulos rojos infectados de malaria en cada etapa de crecimiento con precisión por medio del método de esta realización cuando se desarrolla el medicamento para curar la malaria. Específicamente, si bien los glóbulos rojos infectados de malaria de cada etapa de crecimiento se detectan cuando los glóbulos rojos han sido infectados por parásitos de la malaria cultivados, solo se pueden detectar los glóbulos rojos infectados de la malaria que contienen formas de anillo cuando se añade el medicamento predeterminado para curar la malaria. Esto significa que el
- 10 medicamento para curar la malaria impide el desarrollo de las formas de anillo a trofozoitos. Por otro lado, si los glóbulos rojos infectados de malaria de cada etapa de crecimiento se detectan a nivel comparable incluso si se añade el medicamento para curar la malaria, esto significa que el medicamento no es tan eficaz para la prevención del crecimiento de parásitos de la malaria.
- 15 Como se describió anteriormente, el reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos en esta realización permite que un colorante fluorescente penetre en un glóbulo rojo y al mismo tiempo permite que los parásitos de la malaria sea retenidos en el glóbulo rojo, y por lo tanto el reactivo para detectar glóbulos rojos infectados, que comprende el reactivo para lisar parcialmente la membrana de los glóbulos rojos y un colorante fluorescente de tipo bisbenzimidaz selectivo de ADN, pueda distinguir y detectar glóbulos rojos infectados de malaria,
- 20 tal como la forma de anillo (múltiple) y la forma de anillo (sencilla), que son diferentes en la cantidad total de ADN.
- El método de detección de parásitos de la malaria en esta realización utiliza, en un citómetro de flujo, el reactivo capaz de permitir que un colorante fluorescente penetre en un glóbulo rojo y, simultáneamente, permitir que los parásitos de la malaria sean retenidos en los glóbulos rojo, y por lo tanto el método puede distinguir y detectar
- 25 parásitos de la malaria, a la vez que se distingue la forma de anillo (múltiple) de la forma de anillo (sencilla). Al utilizar el resultado de la detección, la malaria tropical y las otras malaras se pueden distinguir unas de otras.
- En el método de detección de glóbulos rojos infectados de malaria en esta realización, se pueden distinguir los glóbulos rojos infectados de malaria que difieren en la cantidad total de ADN, y se puede detectar la forma de anillo
- 30 (múltiple) como uno de glóbulos rojos infectados, y por lo tanto la razón de infección se puede determinar con una exactitud igual o superior a la razón de infección determinada mediante el método convencional de la observación bajo un microscopio.

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo para lisar parcialmente una membrana celular de un glóbulo rojo infectado con un parásito de la malaria, de tal manera que un parásito de la malaria es retenido en el glóbulo rojo parcialmente lisado y pasa colorante fluorescente a través de la membrana celular parcialmente lisada, que comprende:
- 5 un primer tensioactivo catiónico y
un segundo tensioactivo catiónico que es diferente del primer tensioactivo catiónico;
en donde el reactivo tiene un pH de 5 a 7 y una presión osmótica de 200 a 300 mOsm/kg·H₂O.
- 10 2. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer y segundo tensioactivos catiónicos son las sales de amonio cuaternario que tienen grupos alquilo de cadena larga; y
en donde el número de carbonos del grupo alquilo del segundo tensioactivo catiónico es más pequeño que el del grupo alquilo del primer tensioactivo catiónico.
- 15 3. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2,
en donde el primer tensioactivo catiónico es cloruro de esteariltrimetilamonio, y el segundo tensioactivo catiónico es cloruro de lauriltrimetilamonio.
- 20 4. El reactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente:
un tensioactivo no iónico que no tiene sustancialmente la capacidad de lisis de la membrana de los glóbulos rojos.
- 25 5. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 4,
en donde el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de monoisoestearato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, aceite de ricino polioxietilenado e hidrogenado, polioxietilenfitosterol, polioxietilenfitostanol, polioxietilenlauriléter, polioxietilenoreileter, polioxietilenpolioxipropilendeciltetradecileter, polioxietilenpolioxipropilencetiléter, y monolaurato de polioxietileno.
- 30 6. Un reactivo para detectar un glóbulo rojo infectado de malaria, que comprende:
el reactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y un colorante fluorescente de tipo bisbencimida que tiene preferencia por el ADN sobre el ARN.
- 35 7. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el colorante fluorescente de tipo bisbencimida tiene la siguiente fórmula química.
-
- 40 8. Un método para el análisis de muestras para detectar glóbulos rojos infectados de malaria, que comprende:
- (a) preparar una muestra de medición mediante la mezcla de una muestra con el reactivo de la reivindicación 6 o 7;
- (b) medir la luz fluorescente y la luz dispersada por los glóbulos rojos en la muestra de medición elaborada en la etapa (a), y
- 45 (c) detectar los glóbulos rojos infectados de malaria basándose en la luz fluorescente y la luz dispersada medidas en la etapa (b).
9. El método de análisis de la muestra de acuerdo con la reivindicación 8,
en donde la etapa (b) comprende
- (d) introducir la muestra de medición en una celda de flujo;
- 50 (e) exponer la muestra de medición que fluye en la celda de flujo a la luz de excitación; y
(f) detectar la luz fluorescente y la luz dispersada por los glóbulos rojos en la muestra de medición;
y en donde la etapa (c) comprende

(g) elaborar un diagrama de dispersión basándose en la intensidad de luz fluorescente y la intensidad de la luz dispersada, e identificar una zona de glóbulos rojos infectados de malaria para los glóbulos rojos infectados de malaria en el diagrama de dispersión.

5 10. El método de análisis de la muestra de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la etapa (c) comprende detectar los primeros glóbulos rojos infectados de malaria y/o los segundos glóbulos rojos infectados de malaria basándose en la luz fluorescente y la luz dispersada, teniendo los primeros glóbulos rojos infectados de malaria forma de anillo sencillo y teniendo los segundos glóbulos rojos infectados de malaria dos o más formas de anillo.

10 11. El método de análisis de la muestra de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la etapa (c) comprende detectar y contar los glóbulos rojos infectados de malaria basándose en la luz fluorescente y la luz dispersada, y comprende obtener una razón de infección de malaria basándose en el recuento de glóbulos rojos infectados de malaria (M).

15 12. El método de análisis de la muestra de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la etapa (c) comprende la detección y el recuento de glóbulos blancos basándose en la luz fluorescente y la luz dispersada, y la razón de infección con malaria se obtiene por medio de la siguiente fórmula:

20
$$\text{razón de infección de malaria (\%)} = K * (M * CGB) / (W * CGR) * 100;$$

en donde "WBC" representa una concentración de glóbulos blancos de la muestra, "CGR" representa una concentración de glóbulos rojos de la muestra, "W" representa un recuento de glóbulos blancos, y "K" representa un número constante.

25 13. El método de análisis de la muestra de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la razón de infección de malaria se obtiene por medio de la siguiente fórmula;

30
$$\text{razón de infección de malaria (\%)} = K * M / (CGR * V) * 100;$$

en donde "CGR" representa una concentración de glóbulos rojos de la muestra, "V" representa un volumen de la muestra utilizada para la preparación de la muestra de medición, y "K" representa un número constante.

35 14. El método de análisis de la muestra de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la razón de infección de malaria se obtiene por medio de la siguiente fórmula;

$$\text{razón de infección de malaria (\%)} = M / (G + M) * 100;$$

en donde "G" representa un recuento de glóbulos rojos no infectados de malaria.

40 15. Un método de análisis de la muestra para detectar glóbulos rojos infectados de malaria, que comprende:

- (a) mezclar una muestra de sangre con el reactivo de la reivindicación 6 o la reivindicación 7;
- (b) teñir el ADN del parásito de la malaria con el colorante fluorescente;
- (c) exponer la muestra que contiene los glóbulos rojos, a los que se han aplicado los tratamientos de las etapas
- 45 (a) y (b), a luz irradiada y obtener información óptica; y
- (d) distinguir entre primeros glóbulos rojos que tienen forma de anillo sencillo y segundos glóbulos rojos que tienen dos o más formas de anillo basándose en la información óptica obtenida.

50 16. El método de análisis de la muestra de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la información óptica comprende una primera información acerca de la luz fluorescente y una segunda información acerca de la luz dispersada que se generan mediante la exposición de la muestra a la luz irradiada.

55 17. El método de análisis de la muestra de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la etapa (d) comprende (e) elaborar un diagrama de dispersión de la intensidad de la luz fluorescente y la intensidad de la luz dispersada basándose en la primera y la segunda información, e identificar una primera zona para los primeros glóbulos rojos y una segunda zona para los segundos glóbulos rojos en el diagrama de dispersión.

60 18. El método de análisis de la muestra de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la etapa (d) comprende adicionalmente (f) contar los primeros glóbulos rojos y los segundos glóbulos rojos.

Fig.1

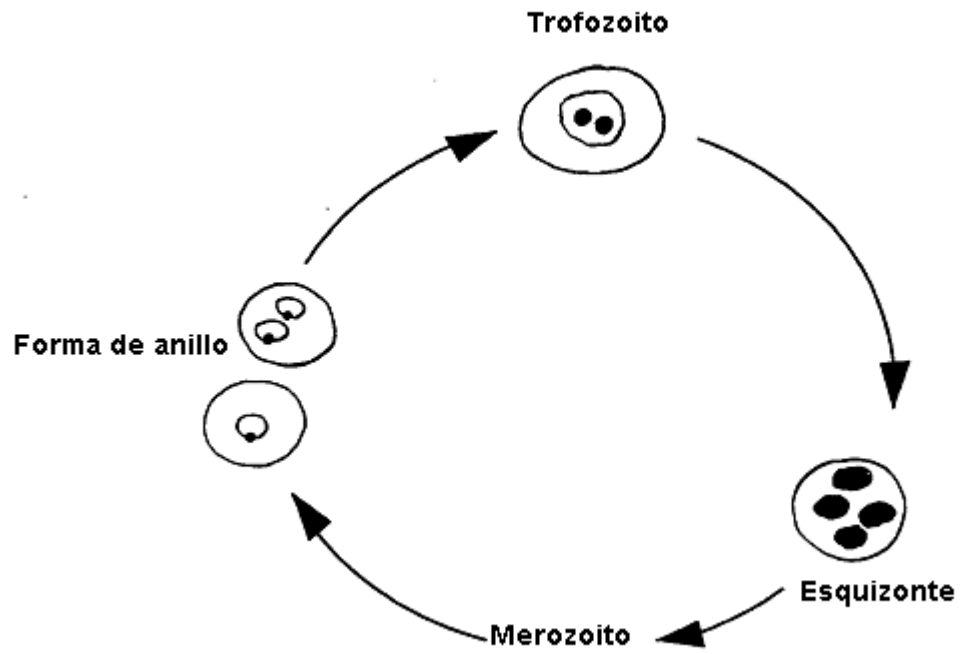


Fig.2

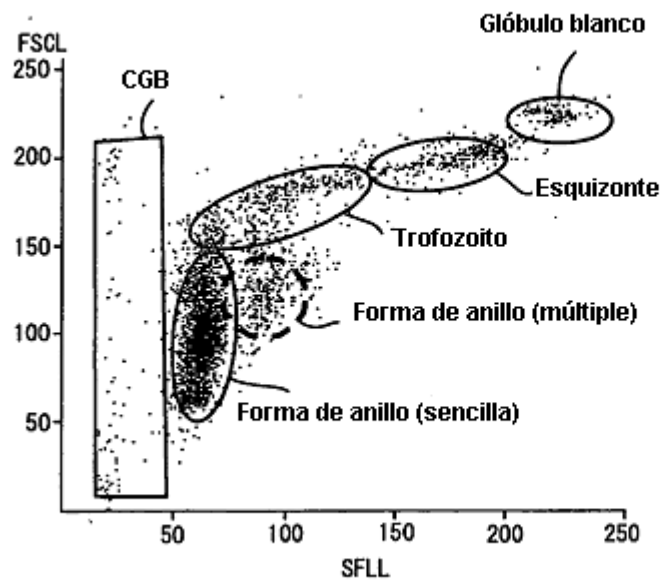


Fig.3

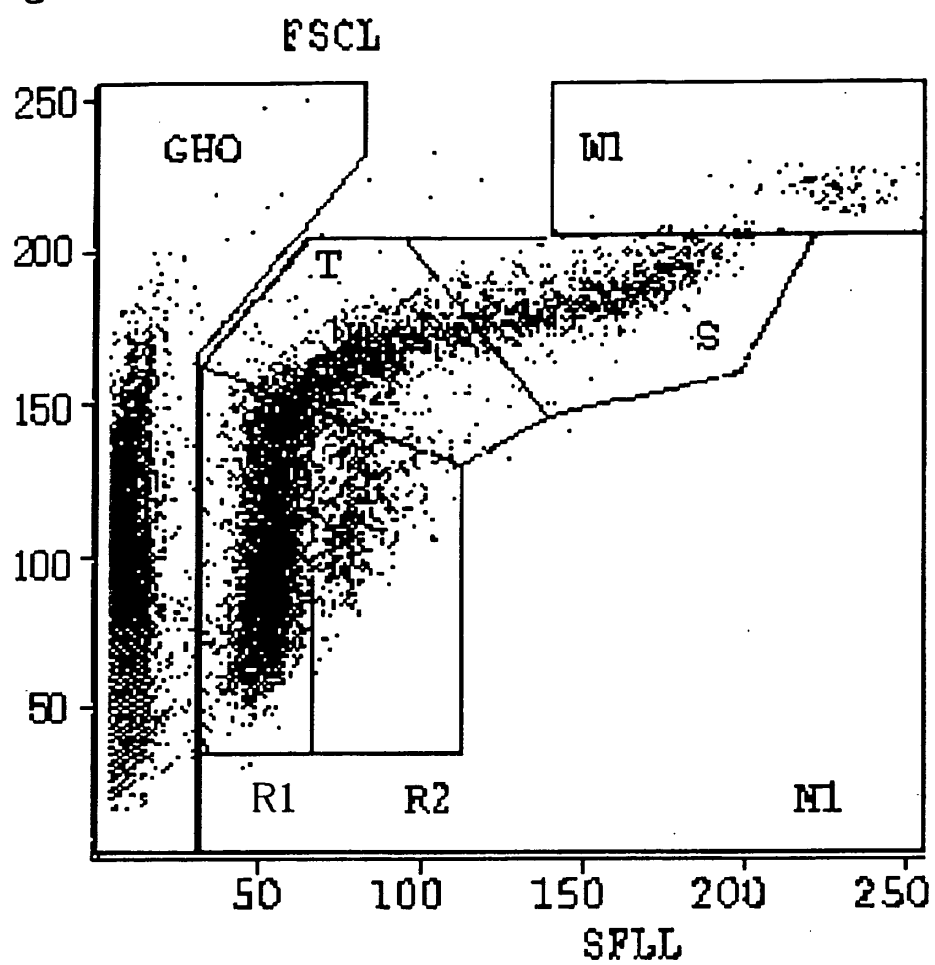


Fig.4

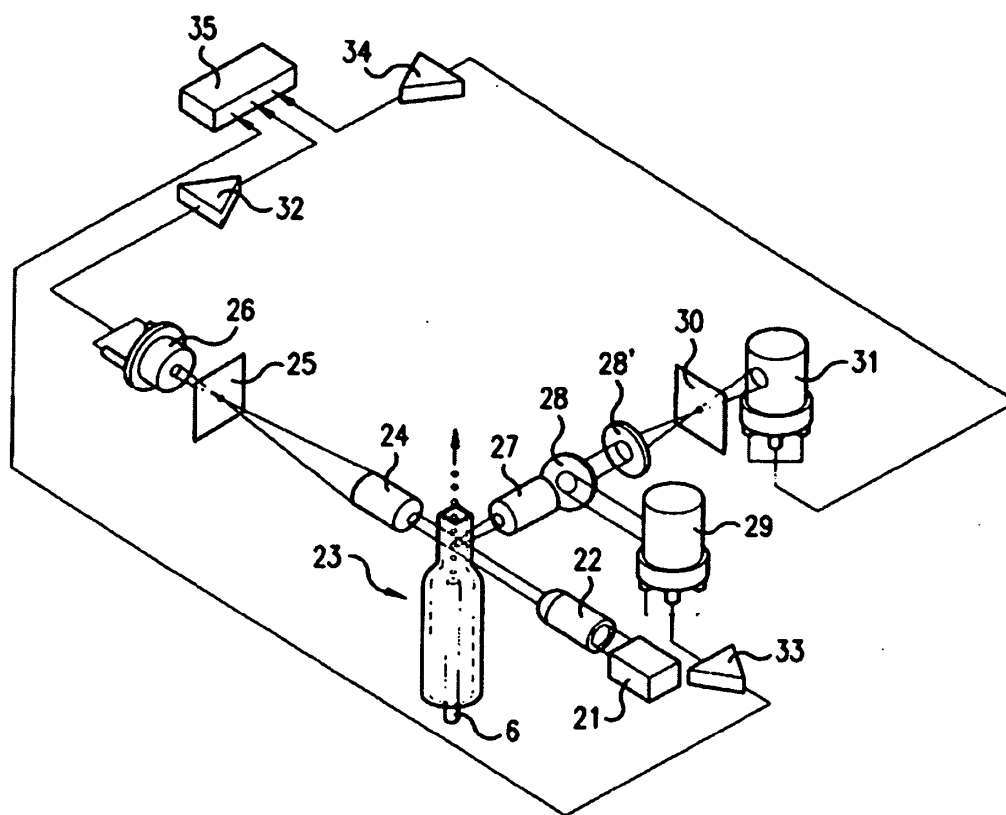


Fig.5

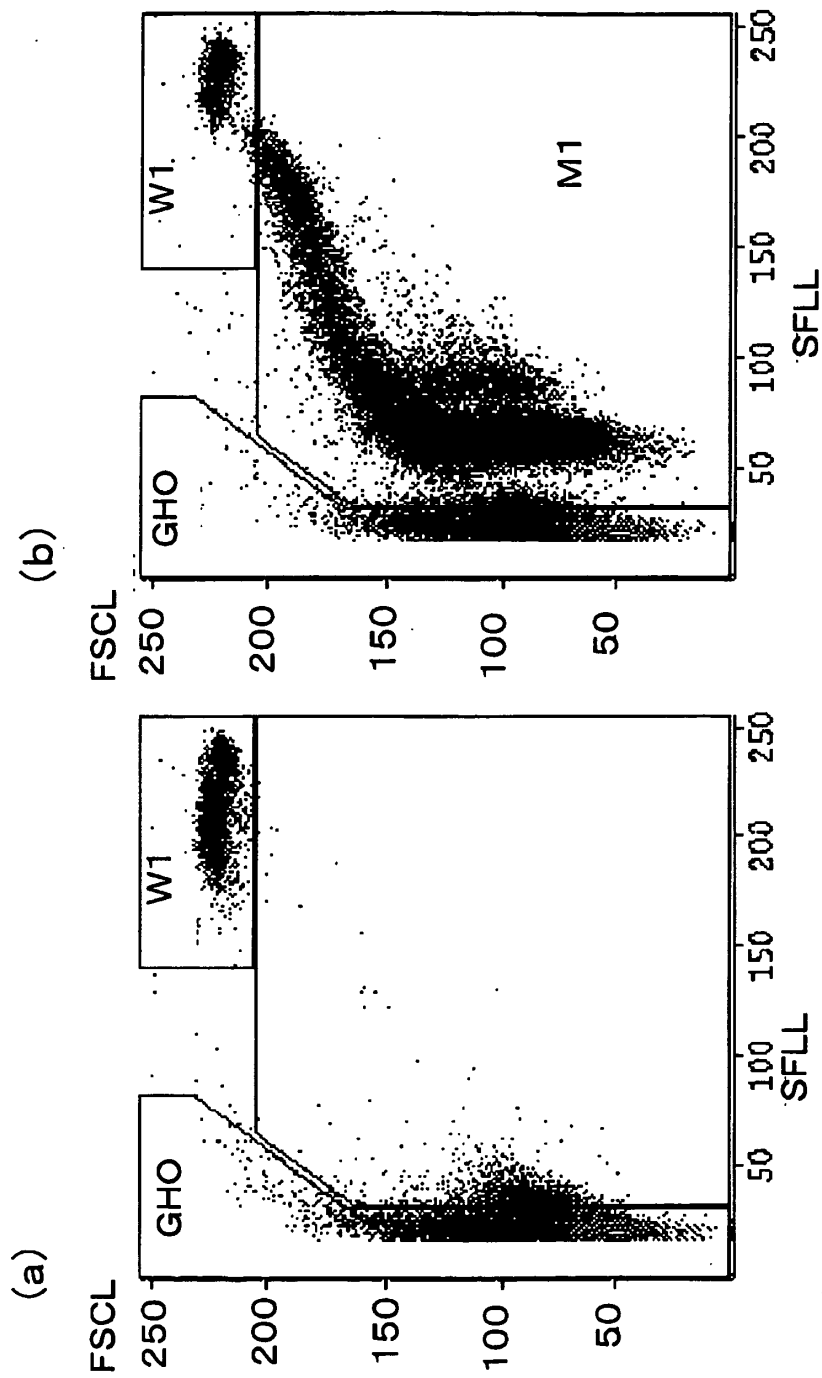


Fig.6

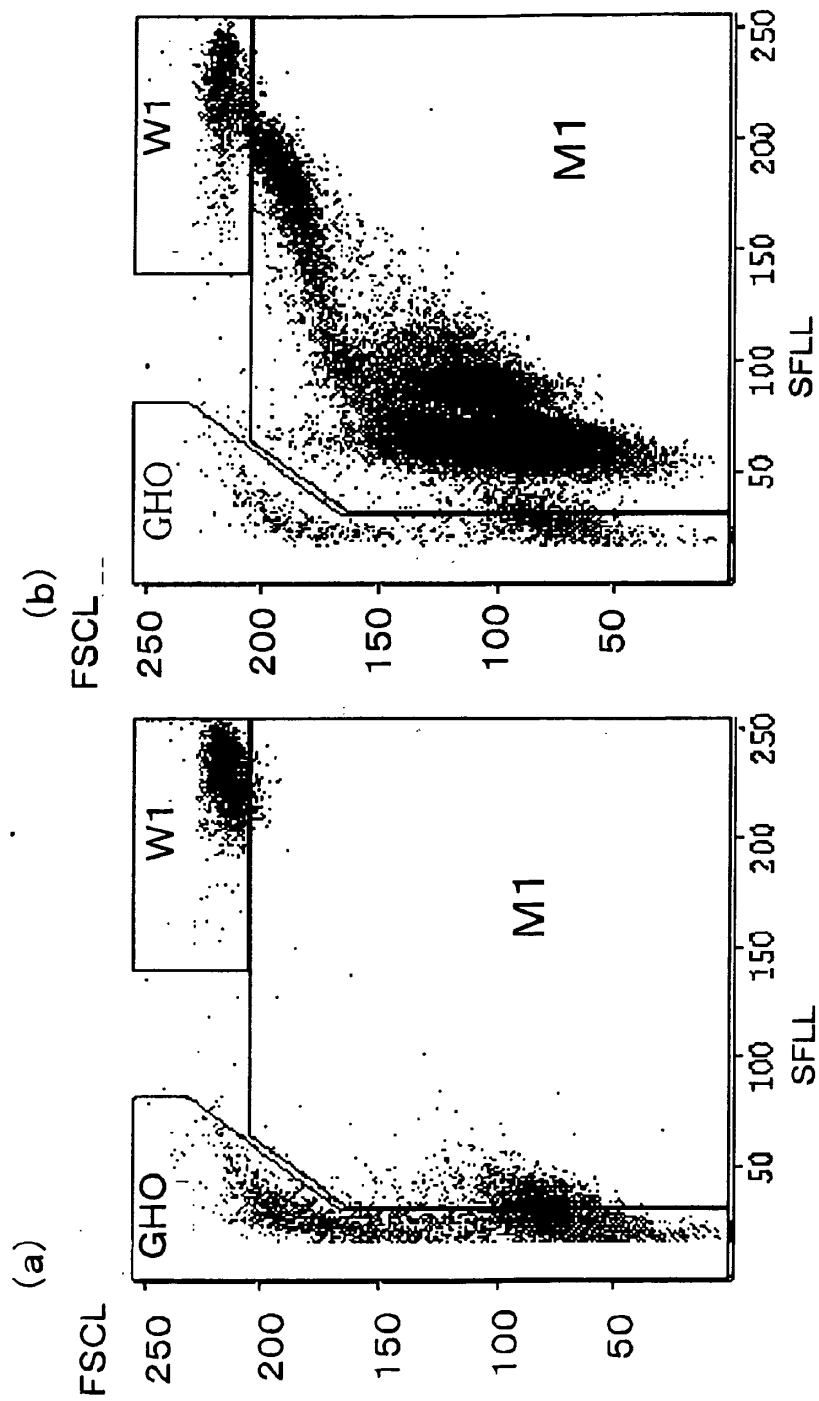


Fig.7

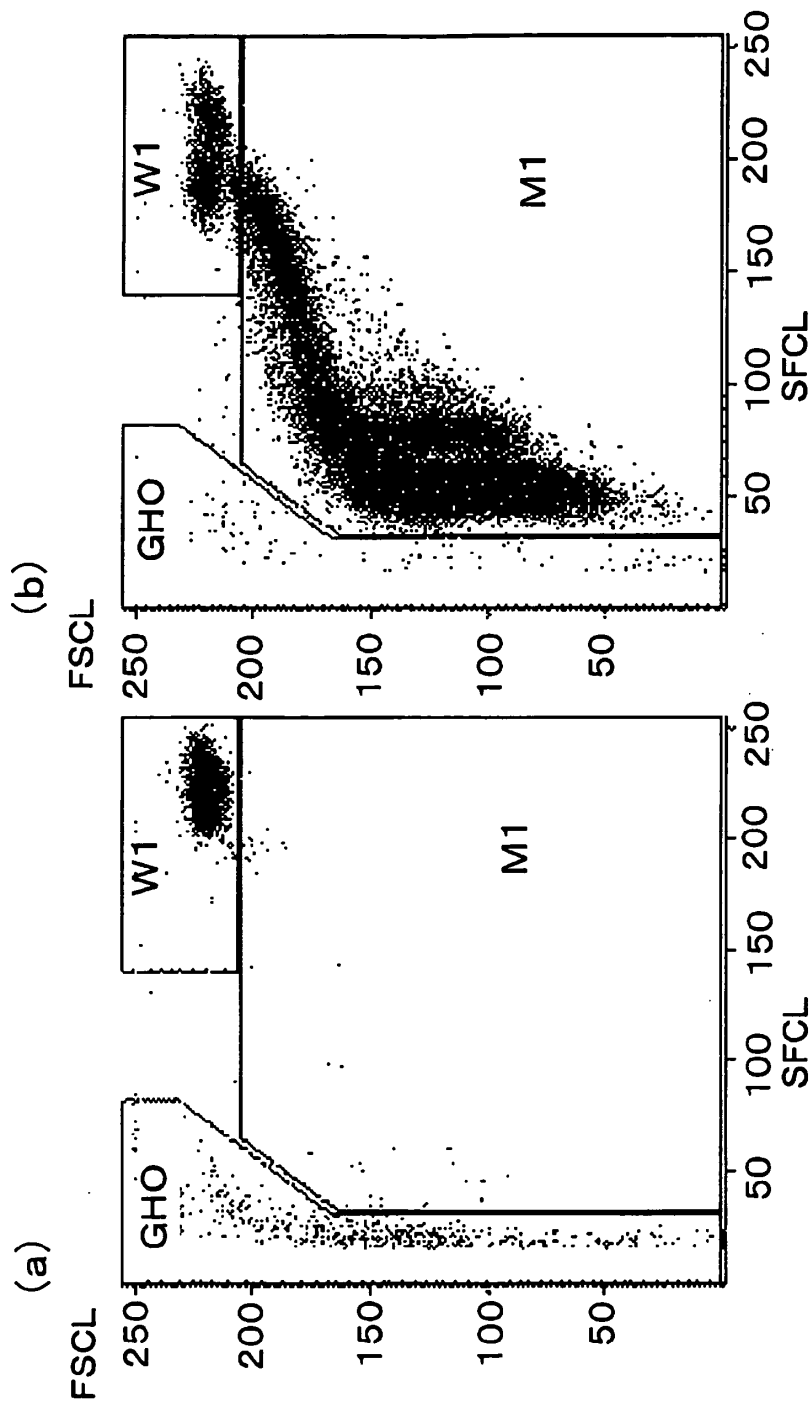


Fig.8

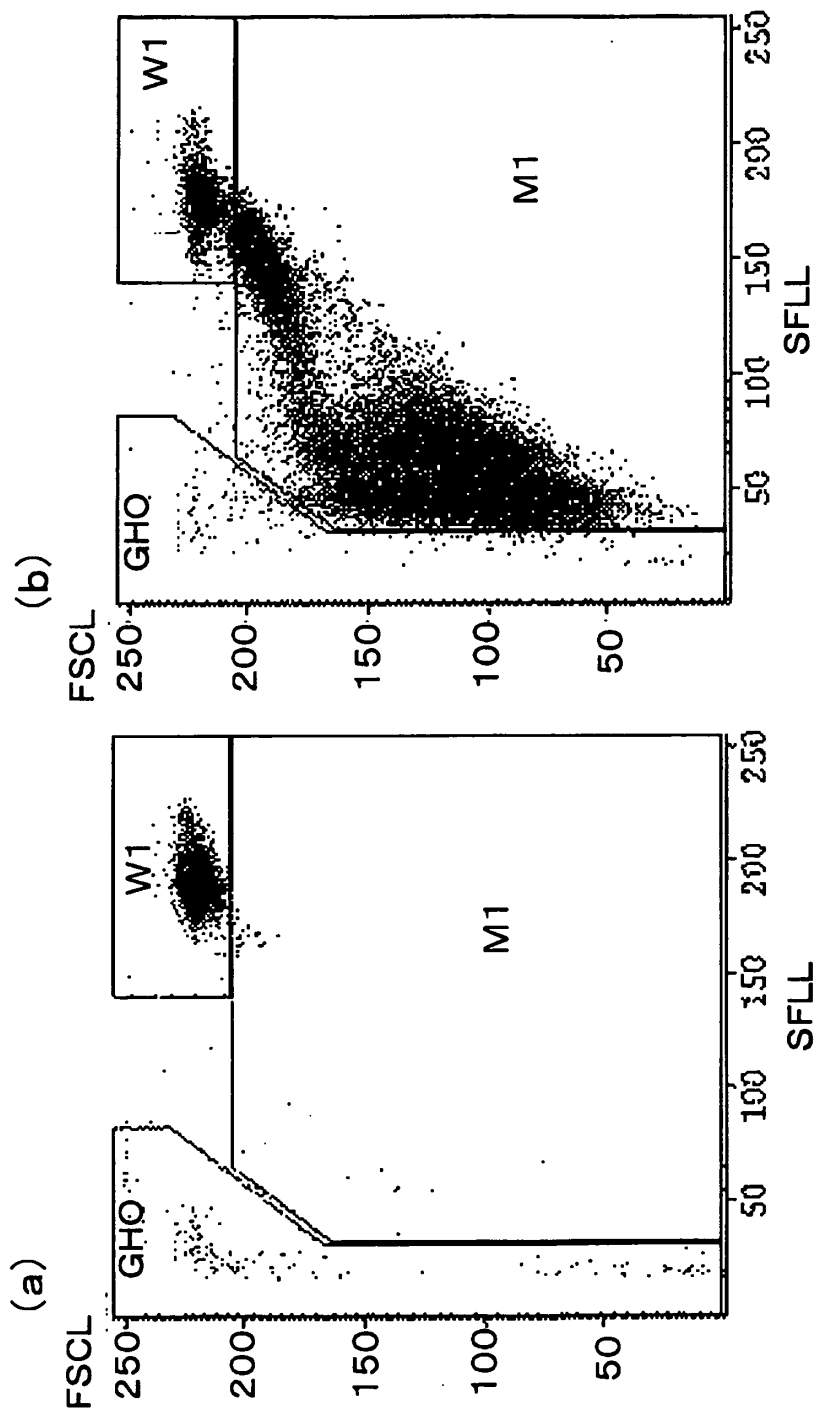


Fig.9

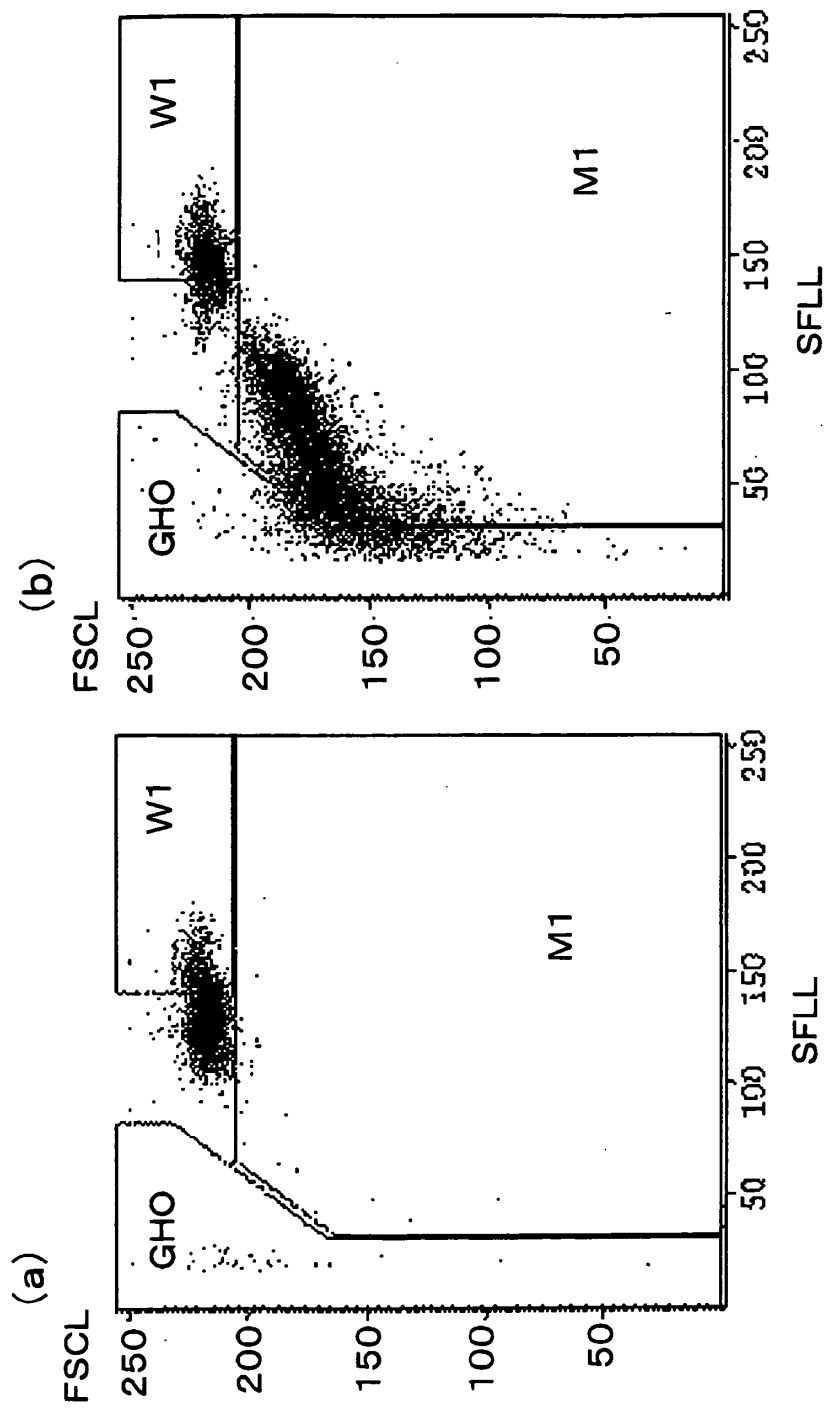


Fig.10

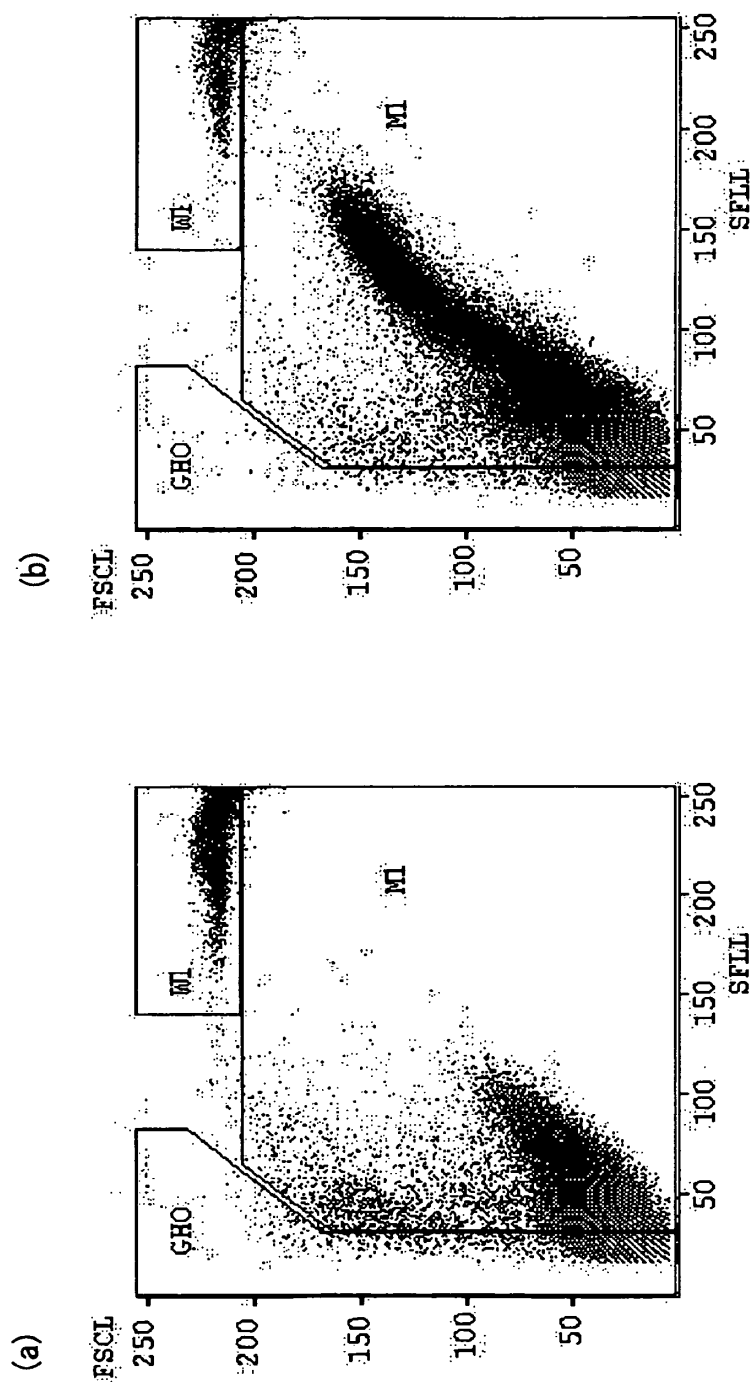


Fig.11

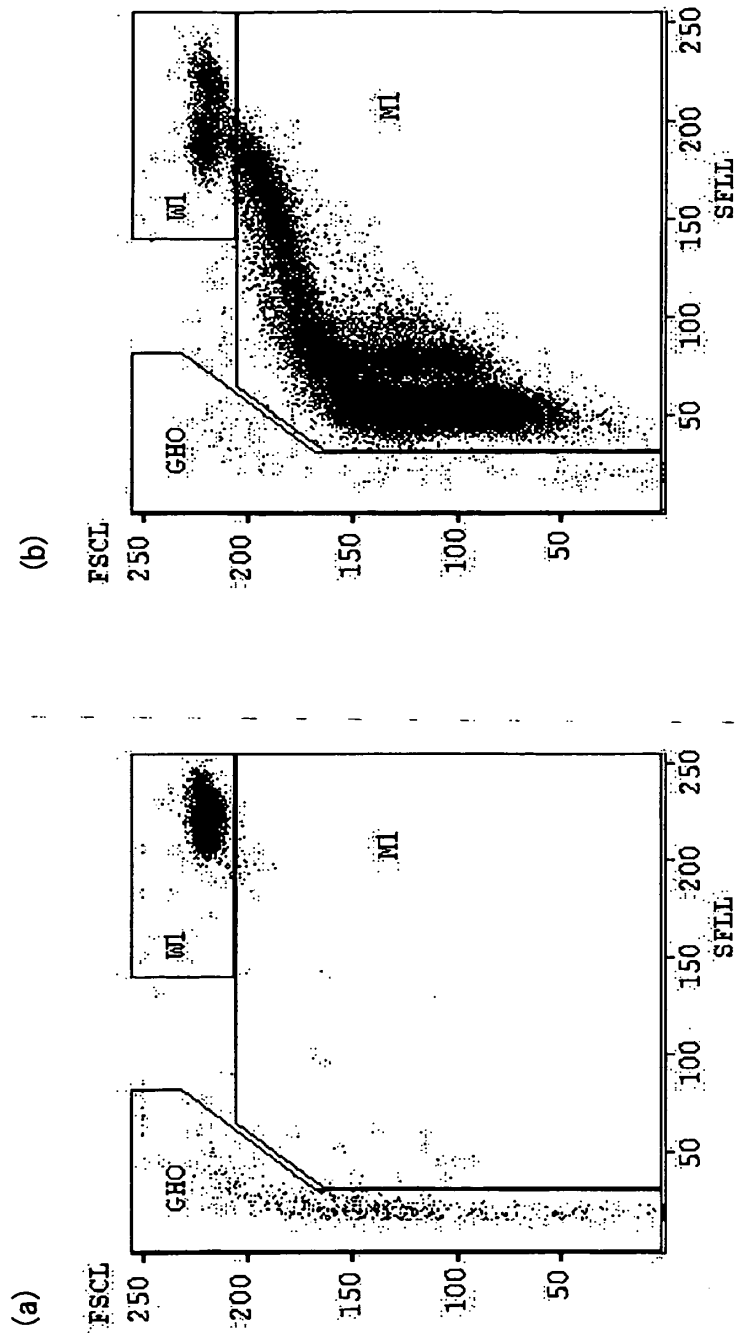


Fig.12

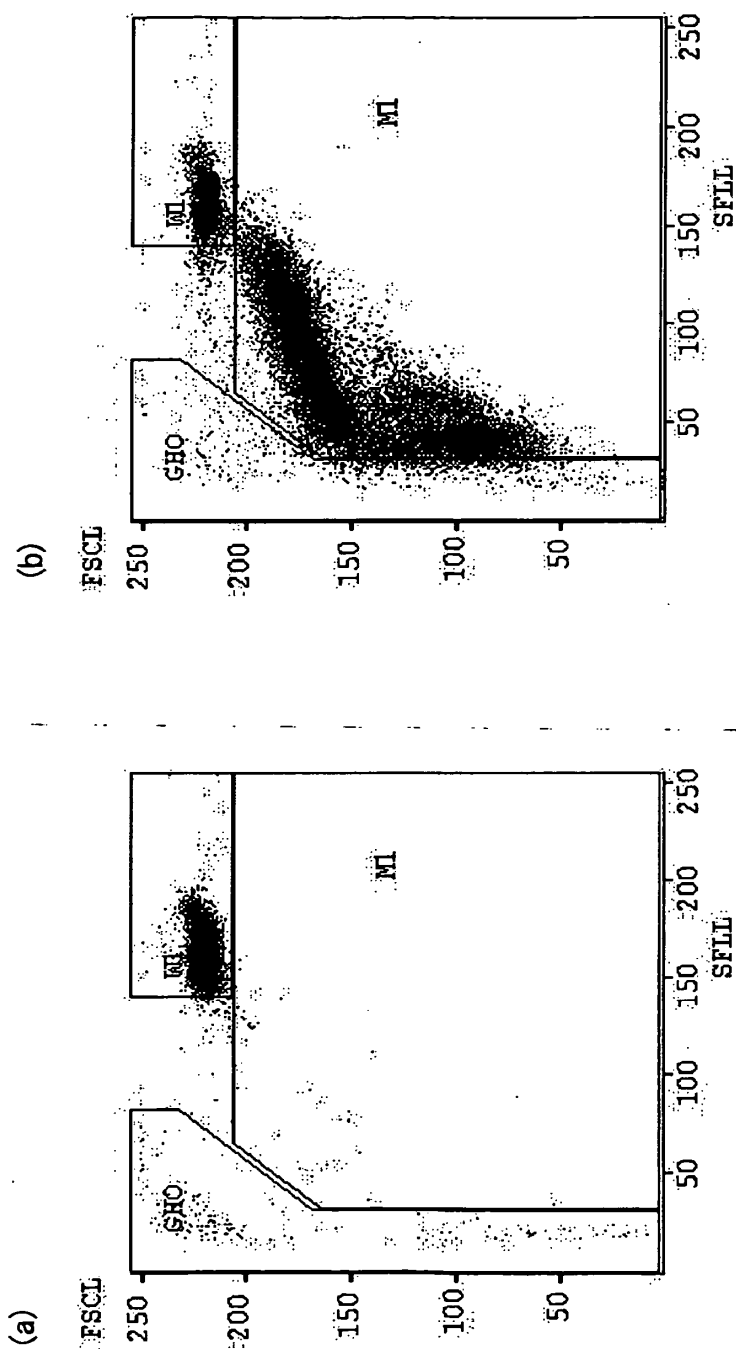


Fig.13

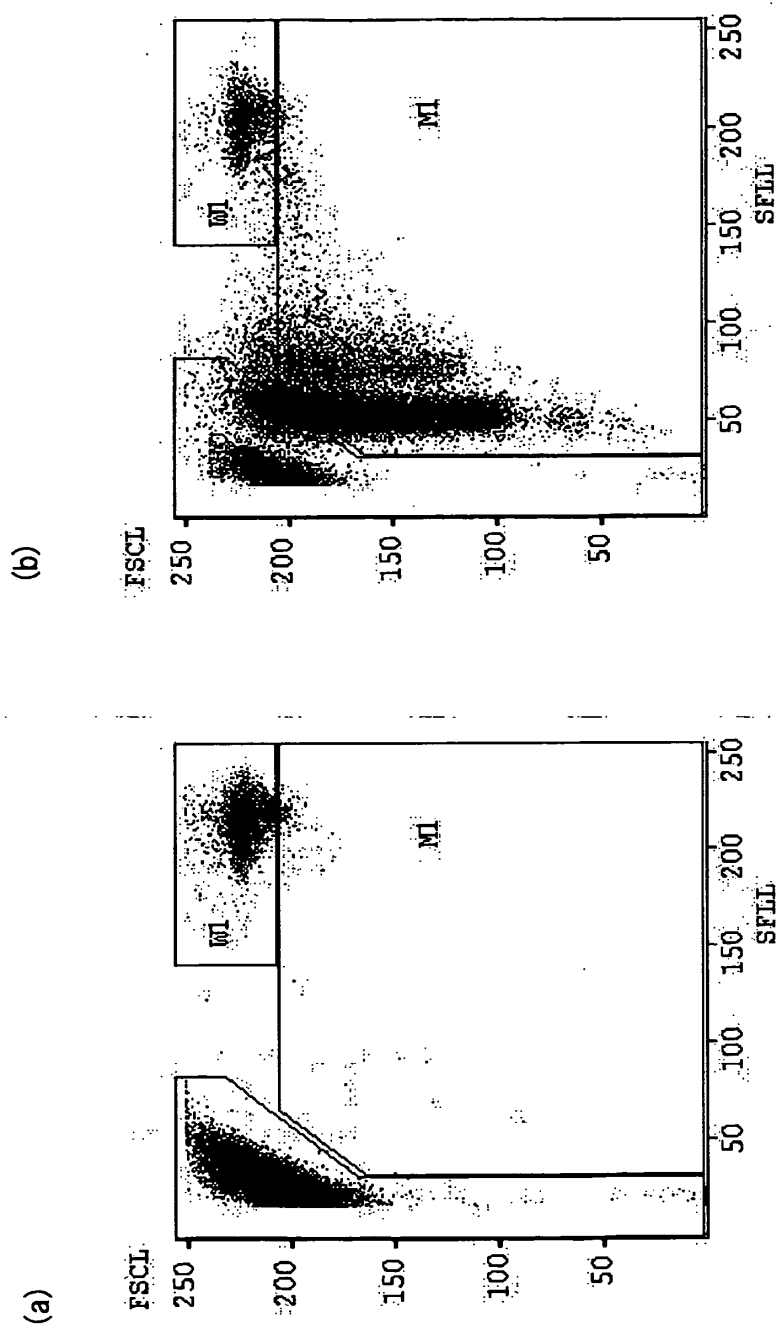


Fig.14

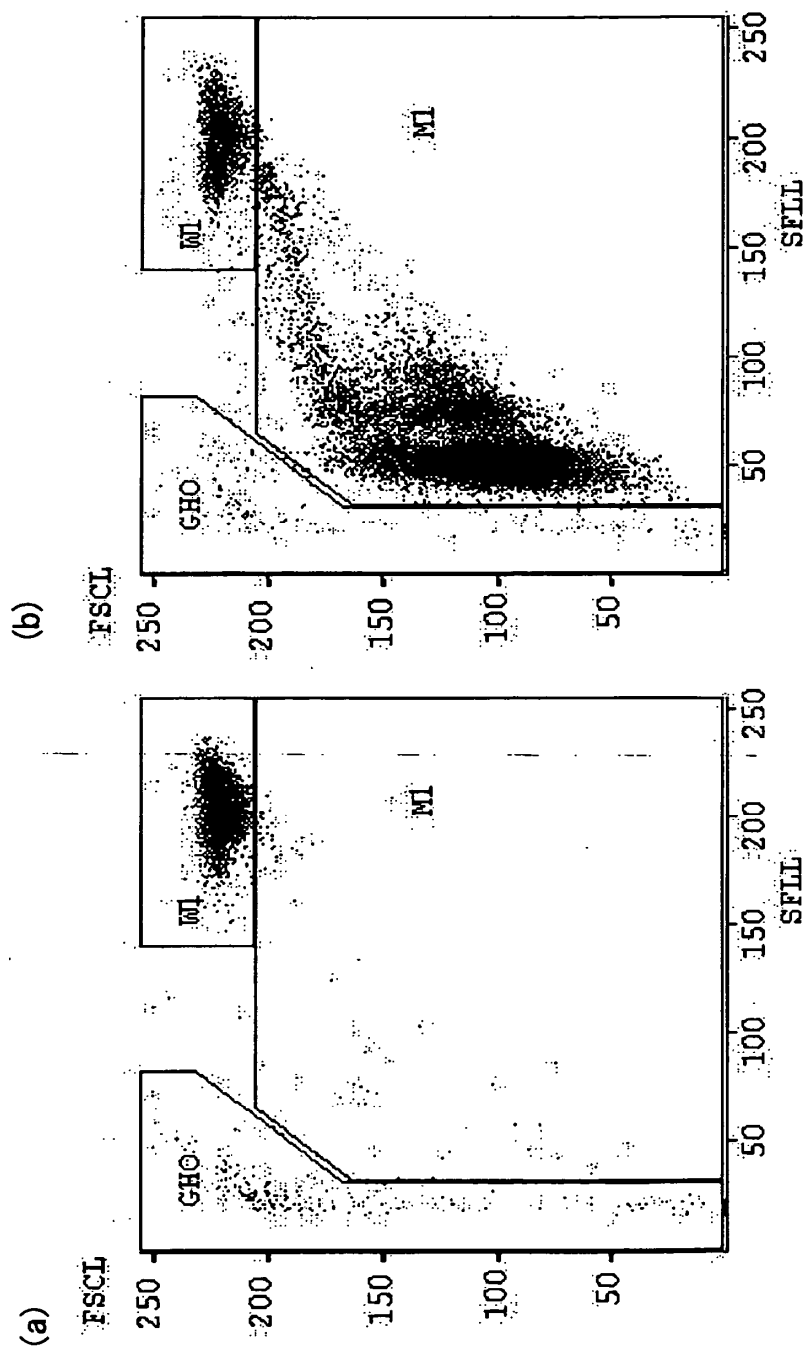


Fig.15

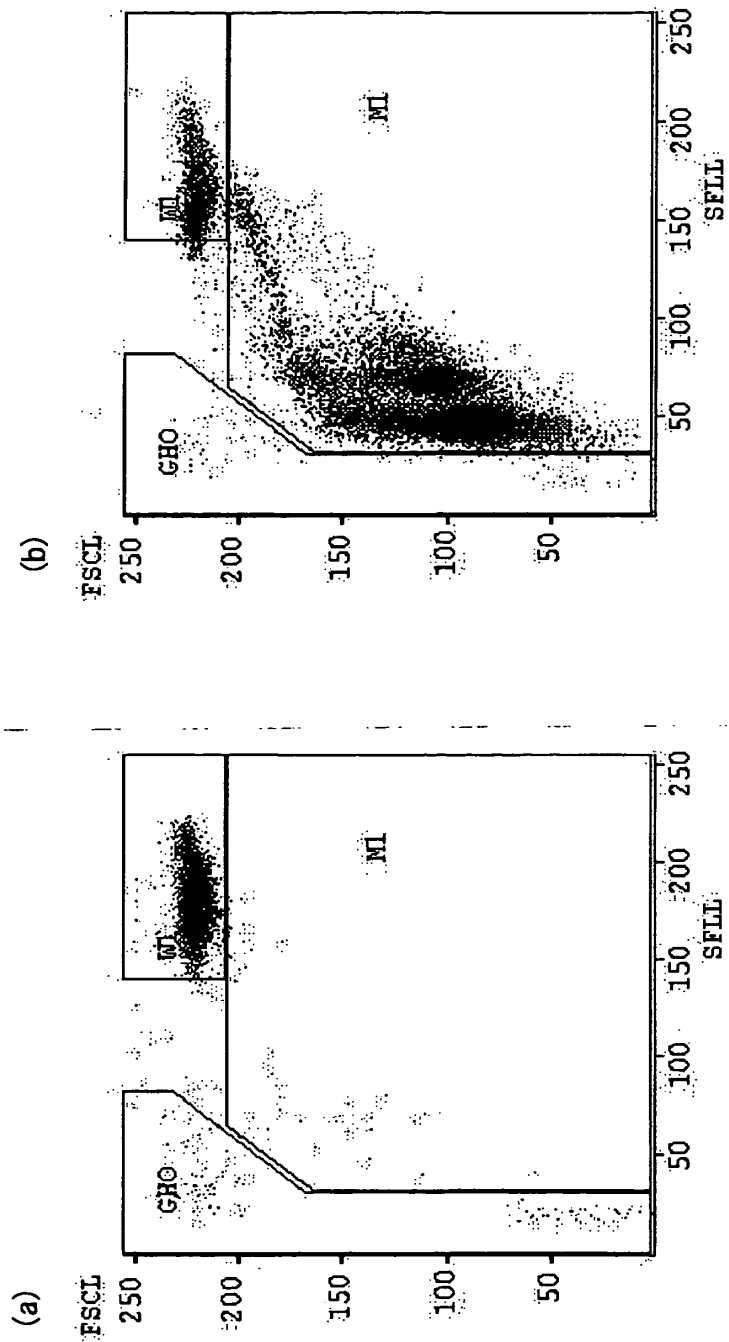


Fig.16

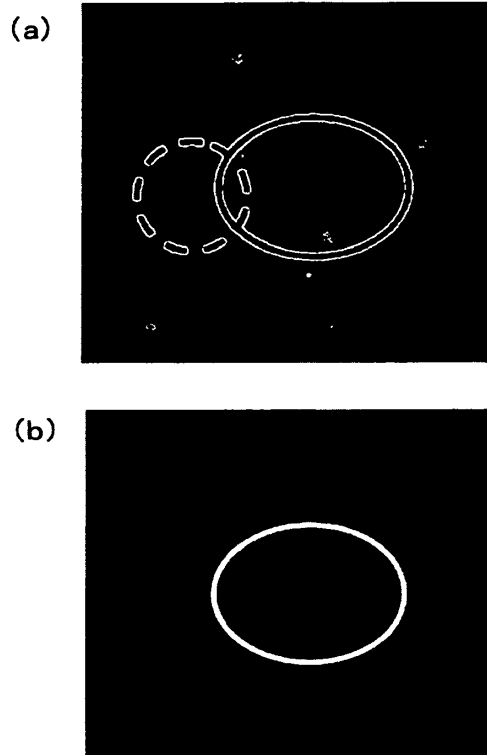


Fig.17

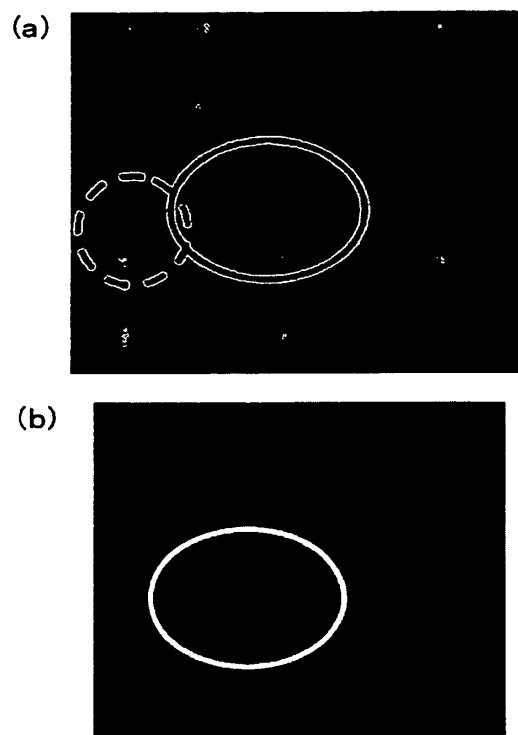


Fig.18

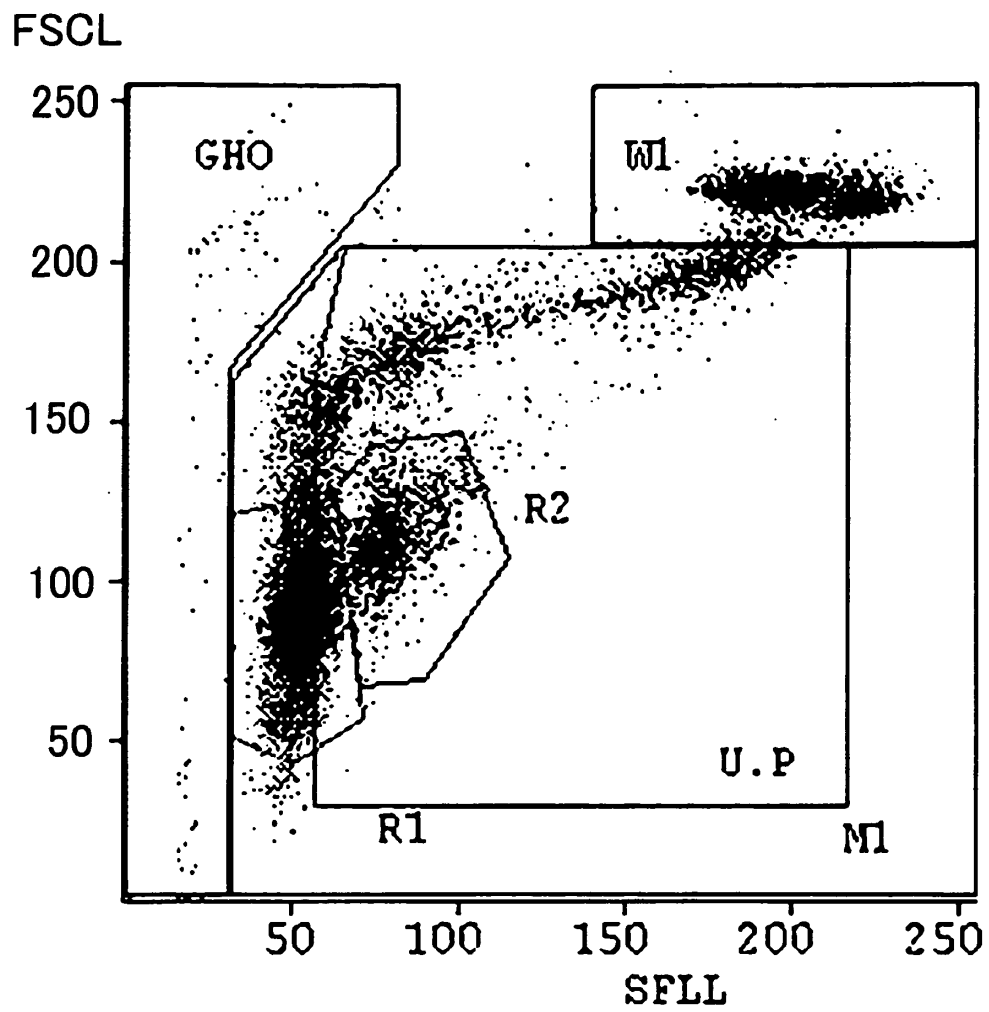


Fig.19

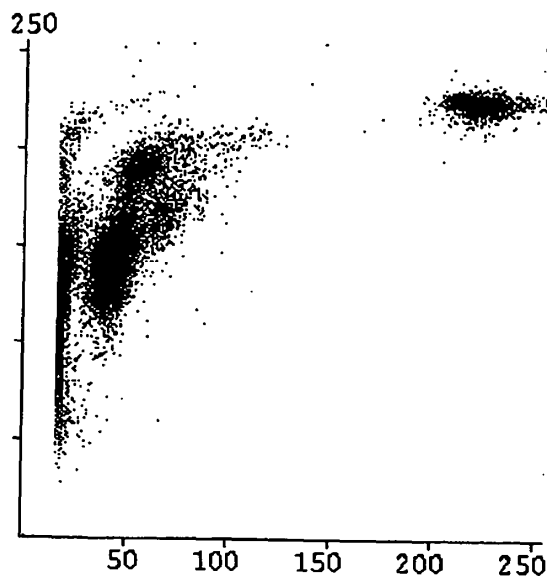


Fig.20

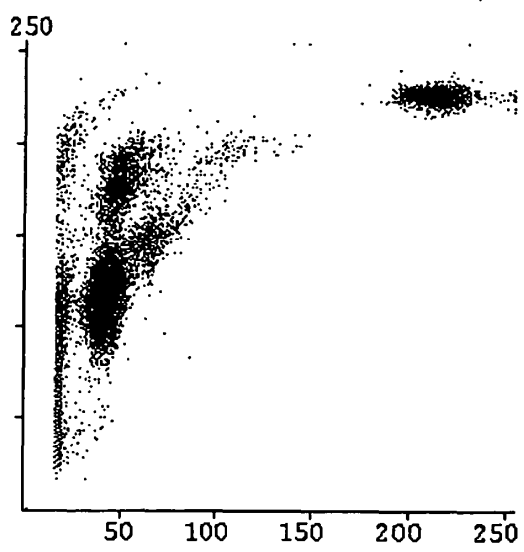


Fig.21

