

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 357**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 11811341 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2635695**

54 Título: **Método para detectar una infección con plasmodio**

30 Prioridad:

23.12.2010 DE 102010064131

25.01.2011 DE 102011003101

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

02.03.2015

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**VAN DEN BOOGAART, JAN y
HAYDEN, OLIVER**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 530 357 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 para detectar una infección con plasmodio

La invención se refiere a un método para detectar una infección con plasmodio en una muestra de sangre del paciente.

5 Las infecciones con plasmodio, como por ejemplo enfermedades de malaria provocadas por los gérmenes patógenos *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* así como *Plasmodium knowlesi*, son las causantes de cientos de millones de nuevas infecciones en todo el mundo cada año. Según las cuentas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se calcula un rango de 300 a 500 millones de personas infectadas anualmente.

10 Con respecto al desarrollo de resistencia creciente frente a los medicamentos existentes para tratar infecciones con plasmodio, existe por lo tanto una necesidad creciente de métodos confiables, económicos, capaces de realizarse rápidamente, que puedan excluir adicionalmente en gran medida los resultados falsos positivos y falsos negativos. Por ejemplo, en regiones con una baja prevalencia de infecciones de malaria serían necesarios métodos de diagnóstico altamente sensibles a fin de reconocer como tales a las pocas personas infectadas.

15 Por otra parte, en regiones del mundo con una alta prevalencia/incidencia, las cuales usualmente se cuentan entre las regiones más pobres del mundo, existe una demanda alta de ensayos de prueba con una especificidad alta a fin de excluir resultados falsos positivos (es decir, reconocer como sanas a las personas sanas).

20 Por lo regular, también existe el problema de que no solamente tiene que investigarse un número extremadamente alto de muestras de paciente, sino que esto también tiene que efectuarse rápidamente, tal como se discutió previamente, porque los resultados del diagnóstico deben estar disponibles en el transcurso de menos de 2 horas. En el caso que esto no sea posible, el paciente tiene que tratarse posiblemente con base en una valoración clínica superficial.

25 Las consecuencias de un diagnóstico de malaria deficiente o falso negativo/falso positivo son variadas: en el caso de un diagnóstico falso positivo el empleo (sin sentido) de medicamentos puede provocar efectos secundarios que podrían evitarse, muy aparte de la carga financiera sobre el sistema de salud pública, así como de la posibilidad de una formación de resistencia al plasmodio. En un estudio del año 2006 se concluyó que un ensayo diagnóstico con una sensibilidad y especificidad respectivas de 95%, que solo necesitara infraestructura mínima, podría evitar más de 100,000 casos letales y más de 400 millones de tratamientos innecesarios (Rafael ME, Taylor T, Magill A et al. Reducing the burden of childhood malaria in Africa: The role of improved diagnosis (Reducción de la carga de malaria infantil en África: el papel del diagnóstico mejorado). Nature. 2006; 444 (suppl 1): 39 - 48)

30

35 En la práctica, un problema principal resulta durante el diagnóstico de enfermedades por parásitos, por ejemplo malaria, cuando el diagnóstico de laboratorio se efectúa solamente cuando aparece una sospecha clínica de que el paciente realmente sufre de una infección de este tipo. En regiones con una prevalencia/incidencia baja, esto puede conducir principalmente a que las personas enfermas no sean tratadas o no sean tratadas a tiempo. Por ejemplo, en un estudio canadiense (Kain et al, 1998, Clinics in Infectious Diseases (La clínica en enfermedades infecciosas) 27, 142 - 149) se reporta que inicialmente no se hizo el diagnóstico correcto para el 59% de todos los viajeros que regresaban infectados de malaria. Transcurrieron 7.6 días en promedio antes de hacerse el diagnóstico correcto y antes de comenzar la terapia para *Plasmodium falciparum* y 5.1 días para *Plasmodium vivax*. Retrasos de este tipo pueden conducir a complicaciones significativas y a una tasa de mortalidad elevada (Humare et al, 1997, Canadian Medical Association Journal 156, 1165 - 1167).

40

Para el diagnóstico de infecciones por plasmodio se encuentran disponibles varios métodos: el método más seguro consiste en un análisis microscópico de sangre, aunque este método es costoso en términos de personal, tiempo y aparatos. Con el método microscópico corriente, el personal técnico capacitado puede determinar de modo confiable el tipo y la etapa de la infección.

45 Además existen las llamadas pruebas diagnósticas rápidas (Rapid Diagnostic Test = RDT). Por ejemplo, en este caso se usan anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos de parásitos. Este ensayo se usa habitualmente para detectar infecciones por *Plasmodium falciparum*.

50 Un ensayo ostensiblemente más sensible para el diagnóstico de malaria consiste en la reacción en cadena de polimerasa, la cual, no obstante, es poco adecuada para casos agudos debido a los altos costes en términos de material y de tiempo.

Entre el grupo de los ensayos de diagnóstico rápido (Rapid Diagnostic Tests o RDT) también se cuentan métodos automatizados que debido a su alto rendimiento son adecuados de modo sobresaliente para métodos de detección

para una cobertura completa. Para esto, véase Hanscheid T, Pinto BG, Pereira I, Christino JM, Valadas E (1999) Avoiding misdiagnosis of malaria: a novel automated method allows specific diagnosis, even in the absence of clinical suspicion. Emerging Infectious diseases (Evitar diagnósticos equivocados de malaria: un método automatizado novedoso permite diagnósticos específicos incluso en ausencia de sospecha clínica) [1999, 5(6): 836-838].

Para la aplicación automatizada, con éxito creciente se aplican los llamados "automated cell counters" (contadores automatizados de células). Ejemplos de estos son los aparatos Advia 2120, Sysmex XE-2100 así como CellaVision DM96. Aparte de su alta tasa de rendimiento, estos aparatos automatizados proporcionan algunas ventajas como, por ejemplo, alta objetividad (sin variabilidad dependiendo del observador), eliminación de variaciones estadísticas que están ligadas usualmente con un conteo manual (conteo de altas cantidades de células), así como la determinación de numerosos parámetros que no estarían disponibles en el caso de un conteo manual y, tal como se indicó, un manejo más eficiente y más efectivo en costes. Algunos de estos aparatos pueden procesar 120 a 150 muestras de pacientes por hora.

Los principios técnicos del conteo celular individual automatizado se basan ya sea en una medición de impedancia (resistencia) o bien en un sistema óptico (medición de luz dispersa o de absorción).

En el caso de métodos de impedancia, el conteo de células así como su determinación de magnitud se efectúan con base en la detección y la medición de las modificaciones de la conductividad eléctrica (resistencia), la cual es causada por una partícula que se mueve a través de una pequeña abertura. Las mismas partículas, por ejemplo células sanguíneas, no conducen electricidad aunque sin embargo se suspenden en un medio de dilución que conduce electricidad. Si una suspensión de células de este tipo se hace pasar por una abertura, la impedancia (resistencia) del conducto eléctrico entre los dos electrodos que se encuentran a cada lado de la abertura, aumenta temporalmente con el paso de una célula individual.

Por ejemplo, en la WO 2005/088301 se describe un método para detectar malaria y otras infecciones por parásitos por medio de una medición de impedancia de este tipo (véase la parte experimental), también en el artículo "Development of an Automated Malaria Discriminant Factor Using VCS Technology" (Desarrollo de un factor discriminante automatizado de malaria usando tecnología VCS), Briggs C et al. Am J Clin Pathol 2006.

En contraste con el método de impedancia, el método óptico comprende la conducción de un rayo de láser a través de una muestra de sangre diluida la cual se detecta por el rayo láser en una corriente continua. Cada célula que pasa por la zona de detección de la célula de paso dispersa la luz enfocada. La luz dispersa se detecta entonces por medio de un fotodetector y se convierte en un impulso eléctrico. La cantidad de impulsos generada aquí es directamente proporcional al número de células que pasa por la zona de detección en un lapso especial de tiempo.

En el caso de métodos ópticos, la dispersión de luz de las células individuales que pasan por la zona de detección se mide en ángulos diferentes. De esta manera se registran informaciones sobre la estructura celular, la forma y la capacidad de reflexión. Estas propiedades pueden usarse para diferenciar entre los diferentes tipos de células sanguíneas y para usar los parámetros derivados y para el diagnóstico de las desviaciones de las células sanguíneas de la norma.

Los valores logrados mediante ambos métodos de medición se enlazan por medio de un diagnóstico diferencial para producir un resultado de diagnóstico con gran valor informativo.

La sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos desempeña un papel principal en el marco del diagnóstico diferencial y por consiguiente se trabaja sin cesar en un mejoramiento de estas propiedades.

Por ejemplo, en la WO 2005/088301 se detectan los valores de medición respecto del volumen celular y monocitos y se incluyen como parámetros para una enfermedad de malaria. Dicho más exactamente, aquí se evalúa la desviación estándar del volumen de las poblaciones de monocitos y linfocitos, es decir su heterogeneidad. Sin embargo, se ha demostrado que este parámetro no es suficientemente específico para el diagnóstico de una infección con parásitos ya que incluso en cualquier otra enfermedad infecciosa (por ejemplo en resfriados) puede llegarse a una modificación del volumen de los linfocitos y monocitos. Además, las mediciones de impedancia de muestras de sangre han demostrado ser propensas a errores; por ejemplo, los resultados de medición pueden falsearse (por ejemplo debido a la viscosidad variante de la suspensión a ensayar).

De manera similar, en "Development of Automated Malaria Discriminant Factor Using VCS Technology" (ya citado) se describe que la desviación estándar del volumen de linfocitos y monocitos se desvía activamente del valor estándar cuando se presenta una infección de malaria.

Una representación ejemplar de diferentes sensibilidades y especificidades usando aparatos de ensayo de sangre automatizados se encuentra en la tabla 3, según la cual la sensibilidad es parcialmente de sólo 48.6 o 52%. De esta

manera no se logra proporcionar procesos con sensibilidad y especificidad superiores en una medida suficiente con los métodos de ensayo corrientes, es decir procesos para detección de una infección con plasmodio que puedan reconocer a un paciente enfermo como tal, así como, por otra parte, a un paciente sano como tal.

5 De acuerdo con nuevos estudios, el poder informativo de los sistemas de ensayo automatizados existentes (y con esto también las sensibilidades/especificidades indicadas) es cuestionable y admite un espacio para mejoramiento. Sobre esto véase el artículo publicado hace poco "Automated haematology analysis to diagnose malaria" (Análisis de hematología automatizado para diagnosticar malaria), Malaria Journal 2010, 9:346.

10 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso para la detección de una infección con plasmodio en una muestra de sangre, el cual da lugar a resultados de ensayo con alta sensibilidad y especificidad. Otro objetivo de la invención es proporcionar un proceso de detección para infecciones de malaria el cual permite una alta especificidad y sensibilidad de malaria usando varios parámetros independientes, independientemente de otras infecciones o del diverso estado de salud de los pacientes. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso tal que pueda realizarse con ayuda de aparatos de análisis de sangre automatizados.

15 Este objetivo se logra de acuerdo con la invención mediante un proceso con las características indicadas en la reivindicación 1.

La invención crea un proceso para detectar una infección con plasmodio en una muestra de sangre de paciente, el cual comprende

- a) realizar un análisis diferencial de los granulocitos neutrófilos polimorfonucleares en la muestra y determinar la distribución del volumen celular y de la densidad celular;
 - 20 b) determinar la cantidad de trombocitos en la muestra;
 - c) determinar la distribución de densidad celular de los trombocitos en la muestra;
 - d) obtener parámetros de muestra a partir de las determinaciones realizadas en a) hasta c); y
 - e) evaluar los parámetros frente a un criterio predeterminado, en cuyo caso se presenta una infección con plasmodio si se cumple el criterio, en cuyo caso el criterio se establece con base en uno o varios parámetros de muestra y se determina con base en una comparación de muestras de sangre infectada frente a valores correspondientes de las muestras de sangre normales.
- 25

La muestra de sangre del paciente analizada según la invención es por lo regular una muestra de sangre humana. Sin embargo, también es posible analizar muestras de sangre de mamíferos.

30 El término "análisis diferencial", tal como se usa en la presente, significa la detección de varios valores mensurables individuales de los componentes de la muestra sanguínea del paciente, los cuales se evalúan finalmente de manera combinada para el diagnóstico a realizar.

35 En el paso a) del proceso de la invención, primero se realiza un análisis diferencial de los granulocitos neutrófilos polimorfonucleares en la muestra respecto de la determinación de la distribución del volumen celular y de la densidad celular. Sin embargo, esto no excluye que otros tipos de leucocitos como, por ejemplo, granulocitos eosinófilos o basófilos también queden incluidos en el análisis.

40 Una desviación de la distribución del volumen celular y de la densidad celular de la norma (estándar) por lo regular indica un estado patológico. En el caso presente, los valores más bajos comparados con los valores normales habitualmente medidos apuntan a una infección con plasmodio. La reducción del volumen celular y de la densidad celular, asociada con la infección con plasmodio, aún debe explicarse respecto de los mecanismos de defensa de los leucocitos que se presentan durante la infección. Por ejemplo, granulocitos neutrófilos migran desde el vaso sanguíneo hacia el tejido, secretan allí enzimas proteolíticas a fin de liberar compuestos intercelulares y fagocitar allí a las bacterias. Esto da lugar a una modificación del volumen celular y de la densidad celular.

45 Sorprendentemente se establecido que la sensibilidad y la especificidad del proceso de detección para una infección con plasmodio pueden elevarse ostensiblemente si además de las determinaciones arriba descritas (es decir, secuencialmente o simultáneamente) se determina tanto la cantidad de trombocitos en la muestra sanguínea de paciente como también la distribución de la densidad celular de los trombocitos en la muestra. Incluso aquí un valor que se desvía hacia abajo de la norma es predictivo de la presencia de una infección con plasmodio. De acuerdo con la invención, esto conduce a sensibilidad y especificidad ostensiblemente elevadas del proceso de detección en comparación con un proceso ya existente.

De los resultados de medición logrados en los pasos a) hasta c) se obtienen los parámetros de muestra y se evalúan frente a un criterio predeterminado, en cuyo caso la infección con plasmodio se presenta al cumplirse el criterio.

5 Los parámetros son magnitudes derivadas; por ejemplo, el término parámetro de volumen celular representa un parámetro relacionado con la distribución de volumen celular como, por ejemplo, el volumen celular promedio o la desviación estándar de la distribución de volumen celular de una subpoblación celular dada.

10 El término "criterio predeterminado", tal como se usa aquí, se refiere a un criterio que se estableció con base en uno o varios parámetros de muestra, y en el caso de la presente invención principalmente con base en parámetros de volumen celular, parámetros de cantidad de células y parámetros de densidad celular. El criterio se determina con base en una comparación de muestras de sangre infectadas con los valores correspondientes de muestras de sangre normales; por ejemplo, para análisis experimentales en los cuales se basa la presente invención se realizó una comparación de muestras de sangre, infectadas con 204 *P. falciparum*, con valores correspondientes de muestras de sangre normales 3240.

15 Combinando y evaluando parámetros de muestras de granulocitos neutrófilos polimorfonucleares (volumen celular y densidad celular) y, adicionalmente, incluyendo la cantidad de trombocitos y la distribución de la densidad celular de los trombocitos en la muestra, de acuerdo con la invención pueden lograrse valores altos inesperados para la sensibilidad y especificidad del proceso de detección. Tal como se presenta en los ejemplos, por medio de este se ha logrado alcanzar valores de especificidad de 99% y valores de sensibilidad de 98%. Esto significa que en caso de análisis de sangre automatizados, de cobertura completa, la cantidad de resultados de diagnóstico falso positivo o falso negativo pudo reducirse en una medida antes no conocida, y casi puede despreciarse. Esto significa un gran progreso con respecto a un diagnóstico seguro de infección con plasmodio, principalmente diagnóstico de malaria y en países que están afectados por una alta prevalencia/incidencia de infecciones de malaria conduce a un mejoramiento ostensible del estado total de la salud por medio de medidas medicinales oportunas y prácticas.

25 En una modalidad del proceso de la invención, la determinación de parámetros se efectúa mediante medición de luz dispersa. Medición de luz dispersa, tal como se describió previamente, ("método óptico"), en contraposición con la medición de impedancia, es un método en el que se utiliza luz láser, en cuyo caso las muestras de sangre (célula por célula) se hacen pasar a través de la luz láser y la deflexión del rayo láser puede detectarse mediante un dispositivo adecuado. El proceso realizado usando el rayo láser se evalúa en la figura 1 adjunta. En este método, el rayo láser dispersado por una célula individual se detecta en diferentes rangos de ángulos (ángulo pequeño/ low angle y ángulo grande/ high angle), los cuales permiten obtener información respectivamente acerca del volumen (ángulo bajo) sobre la densidad (ángulo alto). De acuerdo con la invención, como "ángulo pequeño" se denomina un ángulo de aproximadamente 2° hasta 3°, como un "ángulo grande" se denomina un ángulo de aproximadamente 5° hasta 15° de desviación del eje de la luz láser. Se ha comprobado que la medición de luz dispersa es superior a la medición de impedancia respecto a la susceptibilidad más baja a errores en los resultados de la medición.

35 En una modalidad, la infección con plasmodio es una infección con *P. ovale* (Malaria tertiana), *P. vivax* (Malaria tertiana), *P. malariae* (Malaria quartana) o *P. falciparum* (Malaria tropica). El proceso de detección de acuerdo con la invención puede usarse de igual manera para estas infecciones con plasmodio.

40 En una modalidad, en adición a los pasos del proceso arriba mencionados, se llevan a cabo una esferización y análisis diferencial de los reticulocitos y eritrocitos en la muestra de sangre del paciente por medio de medición de luz dispersa. Aquí también se trata de un análisis diferencial en cuyo caso los parámetros que se van a evaluar finalmente se refieren al volumen celular, la densidad celular así como el contenido de hemoglobina de las células y la porción de reticulocitos. Los reticulocitos son corpúsculos sanguíneos rojos jóvenes que, en contraste con los eritrocitos, contienen ellos mismos además ARN y de esa manera pueden diferenciarse.

45 La esferización de los eritrocitos o reticulocitos es necesaria a fin de convertir las células sanguíneas independientemente de su forma original en una forma capaz de evaluarse con la medición de luz dispersa. Para este propósito, la muestra sanguínea se mezcla con un reactivo que conduce a una esferización de los reticulocitos y eritrocitos. Los reactivos ejemplares se divulgan en US 5,045,472, US 5,284,771, US 5,633,167 así como US 6,114,173. Por ejemplo, US 5,045,472 divulga una mezcla de reactivos que comprende una solución acuosa isotónica, un medio de esferización (por ejemplo, un detergente tal como sales de metal alcalino de un sulfato de alquilo) y una proteína que forma de modo reversible un medio de esferización.

50 Incluyendo los reticulocitos y eritrocitos en el proceso de detección de la invención, la especificidad y la sensibilidad pueden elevarse aún más. La proporción de reticulocitos a eritrocitos es un indicio importante de la presencia de una infección con plasmodio en la sangre. Cuanta más alta sea la proporción de los reticulocitos, es decir de eritrocitos jóvenes inmaduros, tanta más alta es la probabilidad de la presencia de una infección con plasmodio.

55 En otra modalidad, después de una tinción con peroxidasa de todos los leucocitos en la muestra de sangre se realiza un análisis diferencial mediante medición de luz dispersa y absorción.

- La tintura con peroxidasa se efectúa habitualmente por actividad de peroxidasa celular después de la reacción con 4-cloro-1-naftol. 4-cloro-1-naftol y sirve aquí como sustrato que hace posible que el peróxido de hidrógeno forme un precipitado oscuro en sitios endógenos de la actividad de peroxidasa en los gránulos de los leucocitos. En el caso de una medición de luz dispersa, las células con una actividad de peroxidasa más baja o moderada absorben menos luz, mientras que las células con una alta actividad de peroxidasa absorberán más luz.
- En otra forma de realización, adicionalmente después de una tintura con peroxidasa, tal como se describió previamente, se mide la distribución de volumen de los granulocitos neutrófilos. Aquí también es válido que cuanto mayor sea la distribución de volumen de los granulocitos neutrófilos, tanto mayor es la probabilidad de la presencia de una infección con plasmodio en la muestra de sangre del paciente.
- En otra modalidad, adicionalmente como parámetro se usa la desviación estándar de la distribución de volumen de todos los leucocitos después de la tintura con peroxidasa. Cuanto mayor sea la desviación estándar de la distribución de volumen de todos los leucocitos, tanto mayor es la probabilidad de la presencia de una infección con plasmodio.
- En una modalidad, la determinación en a), es decir la realización de un análisis diferencial de los granulocitos neutrófilos polimorfonucleares en la muestra después de lisis al menos los leucocitos eosinófilos y neutrófilos, aunque no los basófilos (reactivo de lisis BASO), se lleva a cabo mediante un reactivo adecuado de lisis. Aquí también la presencia de una distribución amplia de volumen o de densidad es un indicio de la presencia de una infección con plasmodio. Como reactivo de lisis han demostrado ser ventajosas aquí las mezclas a base de ácido ftálico y detergentes; por ejemplo, un reactivo de este tipo puede contener ácido clorhídrico, ácido ftálico, un surfactante así como, opcionalmente, un preservante. La proporción de ácido ftálico y ácido clorhídrico es aproximadamente de 2,5:1 (con base en su concentración en mmol/l. Por medio de este reactivo, los corpúsculos sanguíneos, los trombocitos, así como todos los leucocitos (fuera de los granulocitos basófilos) se lisan. Incluso mediante este proceso adicional puede elevarse el valor predictivo específico de plasmodio.
- En una modalidad, después de una lisis específica de todas las células, fuera de los leucocitos basófilos, se determina la proporción no específica a partir del diagrama de luz dispersa (ángulo pequeño y grande de dispersión). Cuanta más alta es esta porción, tanta más alta es la probabilidad de que está presente una infección con plasmodio.
- Las determinaciones realizadas en el proceso de detección según la invención a), b) y c) son, tal como se describió arriba, predictivas de la presencia de una infección con plasmodio. El término "valores más bajos" en el contexto de la presente invención significa un valor más bajo de la determinación, realizada en el caso individual, en comparación con los valores estándar logrados en las muestras normales de paciente (es decir, muestras de paciente no infectadas).
- En contraposición a esto, la inclusión adicional de los parámetros que se obtienen mediante coloración con peroxidasa, así como la determinación de la distribución de volumen de los granulocitos neutrófilos y la desviación estándar de la distribución de volumen de todos los leucocitos y la determinación de la porción no específica a partir del diagrama de luz dispersa después de lisis específica de todas las células, significa que cuanto más altos sean los valores, tanto mayor es la probabilidad de la presencia de una infección con plasmodio.
- Además, las formas de realización del proceso de la invención se describen detalladamente haciendo referencia a las figuras adjuntas.
- La figura 1 muestra una representación esquemática de un dispositivo 1 para la realización del proceso de la invención.
- La figura 2 muestra una representación esquemática de la luz dispersa de ángulo grande por medio de un glóbulo rojo 11, el cual se relaciona con la granularidad y la densidad de la célula y se mide en un rango típico de 5° hasta 15°. Esto corresponde a la determinación de la densidad celular.
- La figura 3 muestra la determinación del volumen celular (o de la magnitud celular) de la célula 11 en el rango de luz dispersa de ángulo pequeño (2° hasta 3°).
- La figura 4 muestra un diagrama de luz dispersa realizado con el aparato ADVIA 2120i, el cual muestra un desplazamiento ejemplar del volumen 16 y de la densidad 17 para trombocitos y leucocitos polimorfonucleares (PMNx) en caso de muestras sanguíneas infectadas con malaria.
- La figura 5 muestra los resultados de un análisis después de tintura con peroxidasa con el aparato ADVIA 2120i, el cual representa a manera de ejemplo la distribución de volumen y densidad (PEROX Y 26 o PEROX X 27) entre una muestra infectada con malaria 24 y una muestra normal 25. "PEROX Y" 26 designa la amplitud de las poblaciones

negativas de peroxidasa a lo largo del eje Y. En una muestra de malaria ésta parece más largo comparación con una muestra normal. Los resultados para la muestra de malaria 24 tienen un efecto más difuso que la muestra normal 25, lo cual es atribuible a la mayor distribución de volumen 26 y distribución de densidad 27.

- 5 En lo sucesivo se representa a manera de ejemplo la realización del proceso de la invención, así como dos algoritmos que con base en el proceso de la invención permiten la evaluación de los parámetros determinados y una predicción de una infección con plasmodio con alta especificidad y sensibilidad. Las mediciones se realizaron con el sistema ADVIA 2120i de la SIEMENS AG. Se usan las siguientes abreviaturas:

Parámetro	Descripción
PMNx	Distribución de densidad de los leucocitos polimorfonucleares
MPC	Distribución de la densidad celular de los trombocitos
PLT	Cantidad total de los trombocitos en la muestra de sangre
PLT modo	Ajuste de aparato de ADVIA 2120i
%Baso Noise (ruido)	Porción no específica a partir del diagrama de luz dispersa (dispersión de ángulo pequeño y grande) después de lisis específica por medio del reactivo de lisis BASO
%Abnorm	Desviación estándar de la distribución de clúster de todos los leucocitos
PEROX Y Sigma	Distribución de volumen de los granulocitos neutrófilos después de tinción con peroxidasa

- 10 De acuerdo con una primera evaluación de acuerdo con la invención se produjo el siguiente algoritmo 1 para proceso detección para una infección con malaria con alta especificidad:

$$PLT \times MPC / 100 < 47 \text{ y}$$

$$PMNx + 0,1635 \times (PLT \times MPC / 100) < 33$$

- 15 Por medio de este algoritmo se muestra claramente (véase más abajo), que el relacionamiento de los resultados de un análisis diferencial de los granulocitos neutrófilos polimorfonucleares respecto de la distribución de la densidad celular (PMNx) con la cantidad de trombocitos y la distribución de la densidad celular de los trombocitos en la muestra, opcionalmente con la inclusión de otros subalgoritmos (1b y 1c), conduce a una especificidad muy alta.

Incluyendo los otros sub algoritmos

$$PLT \text{ modo} - 30 \times \%Baso \text{ Noise} < 27 \text{ y también}$$

$$Perox \text{ Y Sigma} + 12/70 \times \%Abnorm > 12$$

- 20 se produce una especificidad de ensayo para malaria del 99% así como una sensibilidad de 76,5 %.

El algoritmo 1 puede usarse en este sentido ventajosamente en países con una alta prevalencia de malaria.

Para países con una baja prevalencia de malaria se ofrecería el siguiente algoritmo 2:

$$2a. PMN \text{ peak} + 14 / 140 \times (PLT \times MPC) / 100 < 34$$

$$2b. Baso \text{ Noise} > 0,074$$

- 25 2c. $PLT \text{ Mode} + 25 \times \%Baso \text{ Noise} < 45$

$$2d. Perox \text{ Y Sigma} > 6,6$$

La especificidad observada fue de 90,2 %, la sensibilidad fue de 98,9 %. En otras palabras, mediante el algoritmo 2 puede lograrse una sensibilidad extremadamente alta.

- 30 De esta manera, por medio del algoritmo 1 en una población grande de muestras se pueden reconocer casi todas las muestras positivas para malaria, mientras que el algoritmo 2 es especialmente adecuado para estudios de criba. La combinación de los dos algoritmos puede traer ventajas adicionales.

Listado de números de referencia

1 Dispositivo para la citometría de flujo

- 2 Láser
- 3 Módulos sensor
- 4 Lentes ópticos
- 5 Espejo semitransparente
- 5 6 Pantalla
- 7 Espejo
- 8 Sensor
- 9 Sensor
- 10 Sensor
- 10 11 Célula
- 12 Volumen Baso
- 13 Configuración Baso
- 14 Dispersión PLT de ángulo grande
- 15 Dispersión PLT de ángulo pequeño
- 15 16 Volumen de trombocitos
- 17 Componentes de trombocitos
- 18 Porción no específica a partir del diagrama de luz dispersa
- 19 Linfocitos
- 20 Células grandes no trituradas
- 20 21 Monocitos
- 22 Leucocitos neutrófilos
- 23 Leucocitos eosinófilos
- 24 Muestra de malaria
- 25 Muestra normal
- 25 26 Peroxi-Sigma
- 27 Absorción

REIVINDICACIONES

1. Proceso para detectar una infección con plasmodio en una muestra de sangre del paciente el cual comprende los pasos de:
 - a) realizar un análisis diferencial de los granulocitos neutrófilos polimorfonucleares en la muestra y determinar la distribución del volumen celular y de la densidad celular;
 - b) determinar la cantidad de trombocitos en la muestra;
 - c) determinar la distribución de la densidad celular de los trombocitos en la muestra;
 - d) obtener parámetros de muestra a partir de las determinaciones realizadas en a) - c); y
 - e) evaluar los parámetros frente a un criterio predeterminado, en cuyo caso al cumplirse el criterio se encuentra presente una infección con plasmodio, en cuyo caso el criterio se establece con base en uno o varios parámetros de muestra y se determina con base en una comparación de muestras de sangre infectadas con los valores respectivos de las muestras de sangre normales.
2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la determinación de los parámetros se efectúa por medio de medición de luz dispersa.
3. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el cual la infección con plasmodio es una infección con *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* o *Plasmodium knowlesi*.
4. Proceso de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, en el cual se efectúa adicionalmente una esferización y análisis diferencial de los reticulocitos y eritrocitos mediante medición de luz dispersa y medición de absorción.
5. Proceso de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, en el cual adicionalmente después de una tintura de todos los leucocitos en la muestra se efectúa un análisis diferencial por medio de medición de luz dispersa y absorción.
6. Proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el cual la tintura se realiza por medio de 4-cloro-1-naftol como sustrato.
7. Proceso de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, en el cual adicionalmente después de una tintura se efectúa la determinación de la distribución de volumen de los granulocitos neutrófilos.
8. Proceso de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, en el cual adicionalmente como parámetro se usa la desviación estándar de la distribución de volumen y la distribución de absorción de todos los leucocitos después de tinturar.
9. Proceso de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, en el cual la determinación en a) se efectúa después de lisis al menos los leucocitos eosinófilos y neutrófilos, aunque no los basófilos, por medio de un reactivo de lisis adecuado.
10. Proceso de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, en el cual después de una lisis específica de todas las células, excepto los leucocitos basófilos, se determina la porción no específica a partir del diagrama de luz dispersa (dispersión de ángulo pequeño y de ángulo grande).
11. Proceso de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, en el cual los valores bajos de los parámetros determinados en a), b) y c) son predictivos de la presencia de una infección con plasmodio.
12. Proceso de acuerdo con la reivindicación 7, 8 y 10, en el cual un incremento de los parámetros es predictivo de la presencia de una infección con plasmodio.
13. Proceso de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, el cual se realiza con un aparato automatizado de conteo de células.

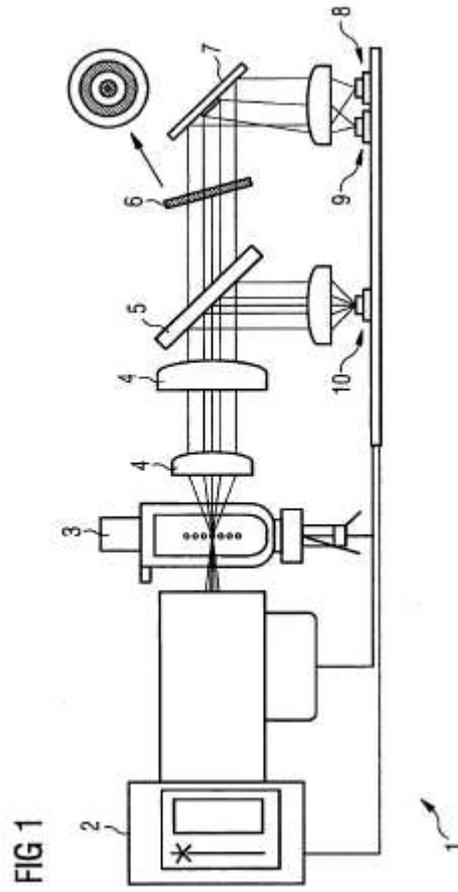


FIG 2

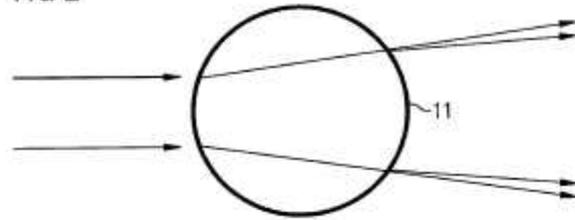
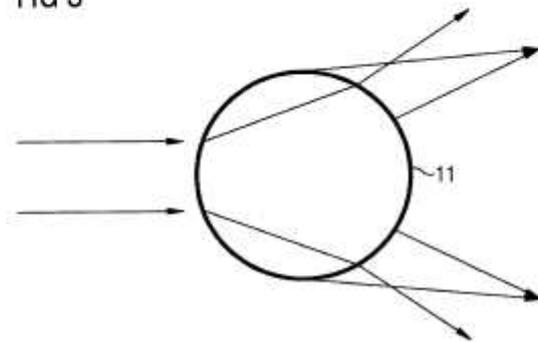
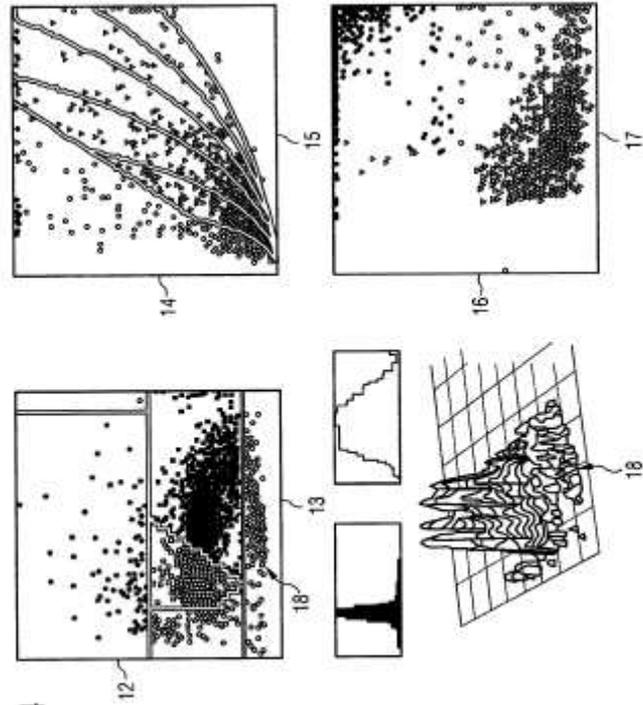
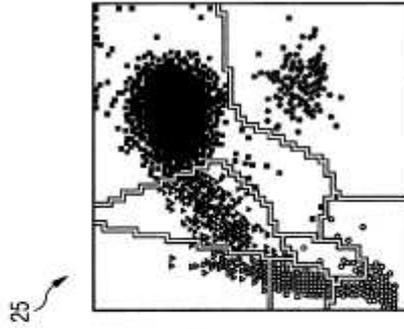


FIG 3

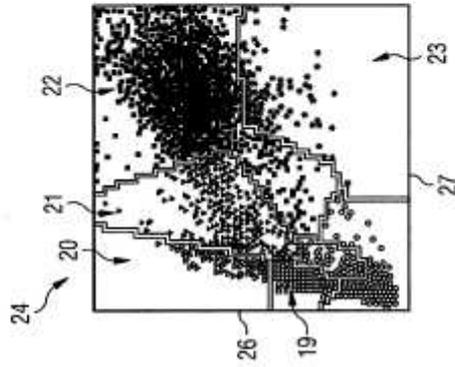






25

FIG 5



24

22

21

20

26

19

23

27