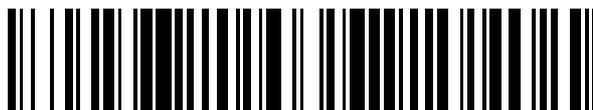


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 678**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**C12Q 1/06** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2010 PCT/EP2010/065615**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012 WO12052046**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2010 E 10768012 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2630487**

54 Título: **Método para determinar un grado de infección de mastitis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.01.2017**

73 Titular/es:

**FOSS ANALYTICAL A/S (100.0%)  
Foss Allé 1  
3400 Hillerød, DK**

72 Inventor/es:

**HOLM, CLAU**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 596 678 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 determinar un grado de infección de mastitis.

5 La presente invención se refiere a un método para determinar un grado de infección de mastitis a partir de un recuento diferencial de células somáticas en la leche de mamífero, particularmente a tal método para determinar la presencia y/o grado de mastitis y más particularmente la mastitis bovina.

10 La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria de un mamífero generalmente causada por una infección bacteriana que, en función de su grado, puede provocar una pérdida grave en el suministro de leche, así como cambios no deseados en la calidad de la leche. Se ha calculado que la pérdida económica anual para los agricultores en Estados Unidos solamente debido a la mastitis bovina es superior a 2 billones de dólares. Se estima que una porción sustancial de esto se debe a la mastitis subclínica.

15 La mastitis clínica generalmente se trata con un tratamiento de antibióticos relativamente costosos. La mastitis subclínica no necesariamente se trata con antibióticos durante la lactancia. Habitualmente, las infecciones subclínicas se eliminan por el sistema inmune, pero la mastitis subclínica puede conducir ocasionalmente a mastitis clínica, o permanecer como una infección subclínica (mastitis crónica).

20 La identificación de la mastitis, particularmente la mastitis bovina, generalmente se basa en el número total de células somáticas en un volumen predeterminado de leche, generalmente mediante el uso de diagnóstico por imágenes o citometría de flujo para realizar el recuento de células somáticas. Al hacer este recuento de células somáticas, los leucocitos (glóbulos blancos) y las células epiteliales (piel) típicamente se cuentan sin ninguna discriminación, particularmente entre los diferentes tipos de leucocitos presentes en la leche.

25 El uso del recuento total de células somáticas como uno de un panel de indicadores empleado para cuantificar el grado de infección de mastitis de una vaca se desvela por Hojsgaard y Friggins, Journal of Dairy Science, vol. 93, n.º 2, 1 de febrero de 2010, páginas 582-592. Además, la medición del recuento total de células somáticas en la leche ovina se desvela por Gonzalo y col., Journal of Dairy Science, vol. 91, n.º 8, 1 de agosto de 2008, páginas 3114-3118.

30 A continuación, los leucocitos de tipo linfocitos, monocitos y macrófagos se denominarán como leucocitos del "Grupo A" y los leucocitos de tipo polimorfonucleares o PMN (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) se denominarán como leucocitos del "Grupo B".

35 Se entiende de forma general que los miembros del Grupo A representan aproximadamente un 85 % del número total de células somáticas en condiciones normales, mientras que los miembros del Grupo B representan aproximadamente un 10 % de las células somáticas en condiciones normales y aumentan entre un 30 % y un 90 % del recuento total de células somáticas, en función del grado de mastitis.

40 Se ha propuesto desde hace tiempo el empleo de un recuento diferencial de células somáticas, que sea una medición de las proporciones relativas de los leucocitos del Grupo A y del Grupo B, e incluso la proporción de los tipos de leucocitos dentro de uno o ambos de estos grupos, como una indicación de uno o más de la presencia o grado y/o susceptibilidad a la mastitis.

45 El recuento celular diferencial generalmente se logra por medio de un marcador de diferenciación, como un tinte metacromático o microperlas fluorescentes o radioactivas, que tiene una o más características medibles, que varía en función del tipo de célula a la cual se asocia. A continuación se emplea un citómetro para contar los eventos (células) usando un sistema de detección sensible a las diferencias en estas características, tal como los cambios en las propiedades fluorescentes, para diferenciarse entre los tipos de células de una forma conocida.

50 Se conoce a partir de, por ejemplo, el documento US 2009/0233329, la realización de un recuento diferencial de células somáticas usando una "prueba de frotis" que emplea una cámara microfluida en forma de cuña novedosa en la que se coloca una mezcla de muestra de leche y un tinte metacromático. Aquí, se diluyen 80 µl de leche con 20 µl de tinte metacromático y una pequeña gota de la mezcla se aplica a la cámara. La identificación de las diferentes células de acuerdo con su coloración y morfología se realiza manual o automáticamente usando análisis de imágenes. Un problema con esto es que debe usarse una nueva cámara microfluida para cada prueba. Además, la altura de la cámara de análisis de imagen puede provocar el emborronamiento de la imagen, lo que puede conducir a complicaciones en la identificación de las células.

55 La citometría de flujo es una alternativa bien conocida para el ensayo de tipo prueba de frotis que se ha descrito anteriormente. En un artículo de M. Hageltorn y M. Alaa Saad, publicado en Am. J. Vet. Res., págs. 2012 a 2016, Volumen 47, n.º 9, septiembre de 1986, se desvela que puede usarse citometría de flujo para distinguir las diferentes poblaciones de leucocitos. Aquí, se diluyó una muestra de leche fresca (no más de 6 horas de antigüedad) en una proporción de 1:200 con una solución salina hipotónica que contenía un 0,0004 % de tinte metacromático de naranja

65

de acridina y el ensayo se realizó mediante el uso de citometría de flujo fluorescente estándar. Esta etapa de dilución se realiza para eliminar de forma eficaz la posibilidad de una coincidencia de las células a medir y las partículas interferentes (tales como partículas de grasa) en el punto de medición, pero añade complejidad a la técnica del ensayo. Además, la dilución elevada requiere que se ensaye un volumen mucho mayor de líquido antes de que pueda lograrse un recuento de células estadísticamente significativo. A su vez, esto aumenta de forma significativa el tiempo del ensayo.

También se describe, por ejemplo, en el documento US 6.979.550, la realización de recuentos diferenciales de células somáticas usando un ensayo de citometría de flujo estándar. Aquí, se desvela que, para realizar el recuento diferencial de células las células somáticas primero deben aislarse de las partículas interferentes en la muestra de leche. Esto se realiza aquí mediante la centrifugación de la muestra de leche para eliminar las partículas interferentes, tales como las partículas de grasa, y concentrar las partículas de interés. Se añade un tinte fluorescente para distinguir todas las células de las partículas interferentes. Después, el recuento de partículas se realiza en un citómetro de flujo estándar usando un sistema de detección de eventos compatible con el tinte fluorescente empleado. La centrifugación aumenta la complejidad del ensayo y en algunos casos puede incluso modificar la muestra de manera tal que ya no sea representativa de todo el conjunto.

Es un objeto de la presente invención abordar al menos uno de los problemas asociados a las técnicas de ensayo de citometría conocidas para el recuento diferencial de células somáticas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para determinar un grado de infección de mastitis que comprende las etapas de i) preparar una muestra sin aislar mediante la adición de un reactivo que contiene un marcador de diferenciación, tal como un tinte metacromático, microesferas fluorescentes o radioactivas, en una cantidad suficiente para proporcionar una diferenciación entre los tipos de células con respecto a la leche de mamífero para diluirla en un intervalo menor de 1:200, preferentemente menor de 1:50, y mucho más preferentemente, menor de 1:5; ii) medir un recuento diferencial de células somáticas en la muestra por medio de un citómetro de flujo que tiene un sistema de detección sensible a las diferencias en el marcador de diferenciación resultantes de la asociación diferencial del marcador a los diferentes tipos de células en la muestra; y iii) determinar una indicación de un grado de infección en función del recuento celular diferencial medido.

Por lo tanto, el inventor ha descubierto de forma sorprendente que con la elección juiciosa de la cantidad de marcador de diferenciación añadido a la muestra, se puede realizar un ensayo de citometría en una muestra sin aislar, básicamente sin diluir, para hacer una medición de recuento diferencial de células somáticas mediante el control de las características de diferenciación del propio marcador, cuyos resultados pueden usarse para determinar una indicación del grado de infección de mastitis. La desviación de estas características de diferenciación de una norma y/o el grado de desviación puede usarse para identificar la existencia, fase y/o probabilidad de contraer mastitis.

De forma útil, la indicación del grado de infección puede incluir la identificación de uno o más de la presencia, probabilidad o nivel de mastitis. Dicha identificación puede utilizarse en varias decisiones de manejo de rebaños, tal como el orden de ordeño de acuerdo con el estado de la mastitis, una mejor limpieza de las garras de ordeño después de ordeñar una vaca infectada o el uso de una garra de ordeño diferente para vacas infectadas, para reducir el riesgo de infección vaca a vaca; la agrupación de vacas con mastitis subclínica, para reducir el riesgo de infección vaca a vaca; la predicción de si una infección de mastitis subclínica evolucionará en un caso clínico y consecuentemente la identificación de aquellas vacas que es probable que se beneficien de un tratamiento antibiótico; y la elección y cría de selecciones.

La presente invención se ilustrará ahora por medio de los ejemplos no limitantes y con referencia a los dibujos de las figuras adjuntas, de las cuales:

La figura 1 muestra un gráfico de puntos de la intensidad de dispersión lateral frente a la fluorescencia verde por citometría de flujo en una muestra de leche en la que las células se marcan de acuerdo con la presente invención;

la figura 2 muestra un gráfico de puntos de la fluorescencia roja frente a verde de la región seleccionada ilustrada en la figura 1;

la figura 3 muestra un gráfico de puntos de la fluorescencia roja frente a la verde de la región seleccionada ilustrada en la figura 2 en la que se identifican diferentes poblaciones de células;

la figura 4 muestra una gráfica del % de PMN medido en el día 0 (leche fresca) frente al % de PMN medido en los días posterior usando un método de acuerdo con la presente invención;

la figura 5 muestra un gráfico de puntos sin selección típico de fluorescencia roja frente a verde mediante citometría de flujo en una muestra de leche preparada de acuerdo con los valores de la tabla 2;

la figura 6 muestra un gráfico de puntos de fluorescencia roja frente a verde de una muestra de leche teñida con una concentración relativamente baja de naranja de acridina;

la figura 7 muestra un gráfico de puntos de fluorescencia roja frente verde que ilustra el efecto de la adición de EDTA a una muestra teñida con una concentración como se emplea en la figura 5;

la figura 8 muestra un gráfico de puntos de rojo frente a verde antes de la adición de PBS; y la figura 9 muestra los efectos de la adición de PBS.

#### EJEMPLO 1

5 Una cantidad de 50  $\mu$ l de leche fría y conservada (con tabuladores de BSM II) de una vaca individual se transfirió a un tubo Eppendorf. Se añaden 50  $\mu$ l de naranja de acridina en PBS (1 mg/ml) y 10  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  (0,1 g/ml, pH = 7) a un reactivo al la vez y se mezclan. Además, después a la mezcla que se ha mencionado anteriormente se le añaden 100  $\mu$ l de PBS y se mezclan. Después de reaccionar durante 1 a 2 minutos a temperatura ambiente, la  
10 muestra se midió en un citómetro de flujo estándar. En este citómetro de flujo, y únicamente a modo de ejemplo, la muestra se dejó fluir a través de la región de detección con una velocidad de 14  $\mu$ l/min. Como el marcador de diferenciación es un tinte metacromático, los tipos celulares pueden diferenciarse mediante el uso de fluorescencia celular. El tinte empleado en el presente ejemplo es naranja de acridina y por tanto, la fluorescencia se excita, en este ejemplo, por un láser azul (488 nm) con control de las intensidades de verde (aquí denominado como FL1-H) y rojo (aquí denominado como FL2-H). Se usó un valor de FL1-H de 400.000 como señal de activación. En la presente disposición también se adquieren señales de dispersión de luz y la intensidad de la luz de dispersión lateral (aquí denominada como SSC-H) se emplea de forma ventajosa para reducir la interferencia (es decir, señales no relacionadas con las células que se van a contar) de la señal adquirida.

20 Para el análisis de los datos, se representa gráficamente la dispersión lateral frente la fluorescencia verde y se muestra en la figura 1. En esta gráfica se dibujó una selección para definir el lugar en la gráfica donde se ubican los eventos de interés, en este ejemplo células. Las partículas que muestran señales de dispersión lateral significativas (SSC-H) pero señales de fluorescencia verde relativamente bajas (FL1-H) pueden identificarse fácilmente como de poco interés y eliminarse de análisis adicionales. Los parámetros exactos para la selección pueden determinarse  
25 fácilmente por el experto en la técnica mediante el uso de técnicas estándar conocidas en la técnica de la citometría de flujo.

Por lo tanto, las partículas de interferencia se eliminan o al menos se reducen de forma significativa. Esta región seleccionada se identifica como P4 y en el presente ejemplo representa un 52,6 % de la cantidad total de eventos  
30 contados.

Después, los eventos P4 seleccionados se representan gráficamente en una gráfica de fluorescencia roja (FL2-H) frente a verde (FL1-H) ilustrada en la figura 2. De forma útil, pero no básicamente, en esta gráfica se dibuja una  
35 segunda selección para definir el lugar en la gráfica donde se ubican los eventos de interés (células) y, por lo tanto, se eliminan partículas de interferencia adicionales. Esta región seleccionada se identifica como P11 y en el presente ejemplo representa un 96,4 % de la cantidad total de eventos contados en la región seleccionada P4 y corresponde a un recuento total de células somáticas de 450.000 células por mililitro (células/ml). Esta gráfica puede emplearse en la determinación del porcentaje de células que pertenecen a los grupos A y B, no obstante, preferentemente, la selección que define todas las células en la región P11 de la figura 2 a continuación se subdivide en regiones que  
40 definen diferentes poblaciones celulares en base a las proporciones relativas de fluorescencia detectada a longitudes de onda características del tinte metacromático empleado, aquí naranja de acridina con intensidades de fluorescencia roja/verde (FL2-H/FL1-H) asociadas. La región P11 de la figura 2 se identifica en la presente figura 3 como P2. Las regiones de los diferentes tipos de células se ilustran como P5, P6, P7 y P8 en la figura 3 y a partir de la observación visual se considera que es más probable que estén compuestas por monocitos (Grupo A); PMN (Grupo B); linfocitos (Grupo A) y macrófagos (Grupo A) respectivamente. Una vez realizadas estas correlaciones  
45 visuales, entonces las proporciones de fluorescencia característica asociada a estas regiones pueden emplearse en un análisis futuro sin depender de la etapa de identificación visual.

La cantidad de eventos en la región P6 que define la llamada región celular del Grupo B (o PMN) en la figura 3 se divide por la cantidad total de células y se multiplica por 100 para obtener el % de Grupo B (PMN) que, en el  
50 presente ejemplo es un 78,2 %.

Para establecer una indicación del grado de infección a partir de este resultado, puede hacerse una comparación  
55 con valores de referencia establecidos mediante el uso de leche de vacas con un grado de infección conocido. Esta comparación puede realizarse matemáticamente mediante el uso de regresión convencional o técnicas quimiométricas aplicadas a los valores de referencia para establecer una relación matemática entre el recuento celular y el grado de infección. El resultado de una muestra desconocida puede procesarse entonces en un procesador de datos usando la relación matemática que se ha establecido anteriormente para llegar a una indicación del grado de infección de la vaca desconocida. Como alternativa, pueden indexarse los intervalos de recuentos  
60 celulares frente al diagnóstico de mastitis y los recuentos celulares medidos se comparan después con los intervalos para proporcionar una indicación del grado de infección. Esto se ilustra únicamente a modo de ejemplo en la Tabla 1 a continuación y puede realizarse manual o automáticamente por medio de un procesador de datos.

Tabla 1

Recuento de células somáticas (células/ml)	% de PMN	Diagnóstico de mastitis
>500.000	-	Mastitis clínica o subclínica
400.001 - 500.000	≥30	Mastitis subclínica
400.001 - 500.000	<30	Sin mastitis
300.001 - 400.000	≥40	Mastitis subclínica
300.001 - 400.000	<40	Sin mastitis
200.001 - 300.000	≥50	Mastitis subclínica
200.001 - 300.000	<50	Sin mastitis
100.001 - 200.000	≥60	Mastitis subclínica
100.001 - 200.000	<60	Sin mastitis
50.000 - 100.000	≥70	Mastitis subclínica
50.000 - 100.000	<70	Sin mastitis
<50.000	-	Sin mastitis

Por lo tanto, en el presente ejemplo, un valor de PMN de un 78 %, junto con el recuento total de células somáticas de 450.000 indica mastitis subclínica. Se apreciará por los expertos en la técnica que la indicación del grado de infección puede presentarse entonces a un usuario en varias formas diferentes sin apartarse de la invención como se reivindica, tal como SÍ/NO a la presencia de mastitis y mastitis subclínica, o ambas, o como un nivel de infección o como una predicción de contraer mastitis.

#### EJEMPLO 2

Se conservó leche de una vaca individual (con tabuladores de BSM II) y se calentó a 40 °C antes del análisis. Un volumen de 50 µl de leche se transfiere a un tubo Eppendorf. Se añaden 160 µl de un reactivo de naranja de acridina (0,3 mg/ml de naranja de acridina y 0,03 mg/ml de Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>EDTA en PBS) y se añaden. Después de reaccionar durante un minuto a temperatura ambiente, la mezcla se midió en un citómetro de flujo estándar usado en el Ejemplo 1. En el citómetro de flujo, la muestra se mide con una velocidad de 100 µl/min y se estimula nuevamente con láser azul (488 nm). Se usa un valor de FL1-H de 200.000 como señal de activación. Se adquieren de nuevo señales fluorescentes (FL1-H, FL2-H) y señales de dispersión de luz (dispersión lateral, SSC-H).

El análisis de los datos es similar al usado en el Ejemplo 1, los resultados son los mismos, lo que indica un nivel de PMN de aproximadamente un 78,2 %. Esto ilustra que el método de acuerdo con la presente invención es adecuado para la aplicación industrial (en oposición a la investigación) dado que las velocidades de flujo pueden hacerse relativamente altas y los aditivos pueden mezclarse previamente y añadirse como un único reactivo sin pérdida significativa en la precisión de predicción.

Usando los mismos parámetros experimentales, se hicieron mediciones en nueve muestras adicionales y las mediciones se repitieron después de un día (día 1 en la figura 4) y de nuevo después de tres días (día 3 en la figura 4). Los resultados se ilustran en la figura 4 y muestran que los resultados de las mediciones del día 1 son comparables con los resultados obtenidos cuando la muestra estaba fresca (día 0 en la figura 4) y que después de tres días, los valores medidos son únicamente ligeramente inferiores a los del día 1 (y fresco). Esto indica que el método de acuerdo con la presente invención puede utilizarse para determinar una indicación de un grado de infección incluso en las muestras conservadas durante hasta tres días. Esta es una ventaja al usar el método para medir las muestras de leche recibidas en un laboratorio central de productores lecheros que se encuentran algo alejados. En este caso, las muestras recibidas son típicamente muestras conservadas de uno o dos días de antigüedad. Además, esto indica que el método también puede utilizarse para distinguir las células viables, dado que la mortalidad aumenta con la edad.

Una característica fundamental de la presente invención es que una cantidad adecuada de un marcador de diferenciación, por ejemplo tinte metacromático de naranja de acridina, se añade a una muestra que es suficiente para permitir la diferenciación de las células somáticas usando citometría de flujo, pero que no diluye de forma adversa la muestra proporcionando un efecto de separación como se ha analizado anteriormente. Puede determinarse un nivel adecuado empíricamente, usando ensayo y error razonable, mediante inspección visual de los gráficos de puntos adecuados como se describirá a continuación únicamente a modo de ejemplo:

Se prepararon los siguientes reactivos: 1 mg/ml de naranja de acridina en PBS, 0,1 g/ml de Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>EDTA (pH = 7) y PBS de intensidad normal. Se usó una muestra de leche con diferentes tipos de células y se mezcló con los reactivos usando las siguientes combinaciones:

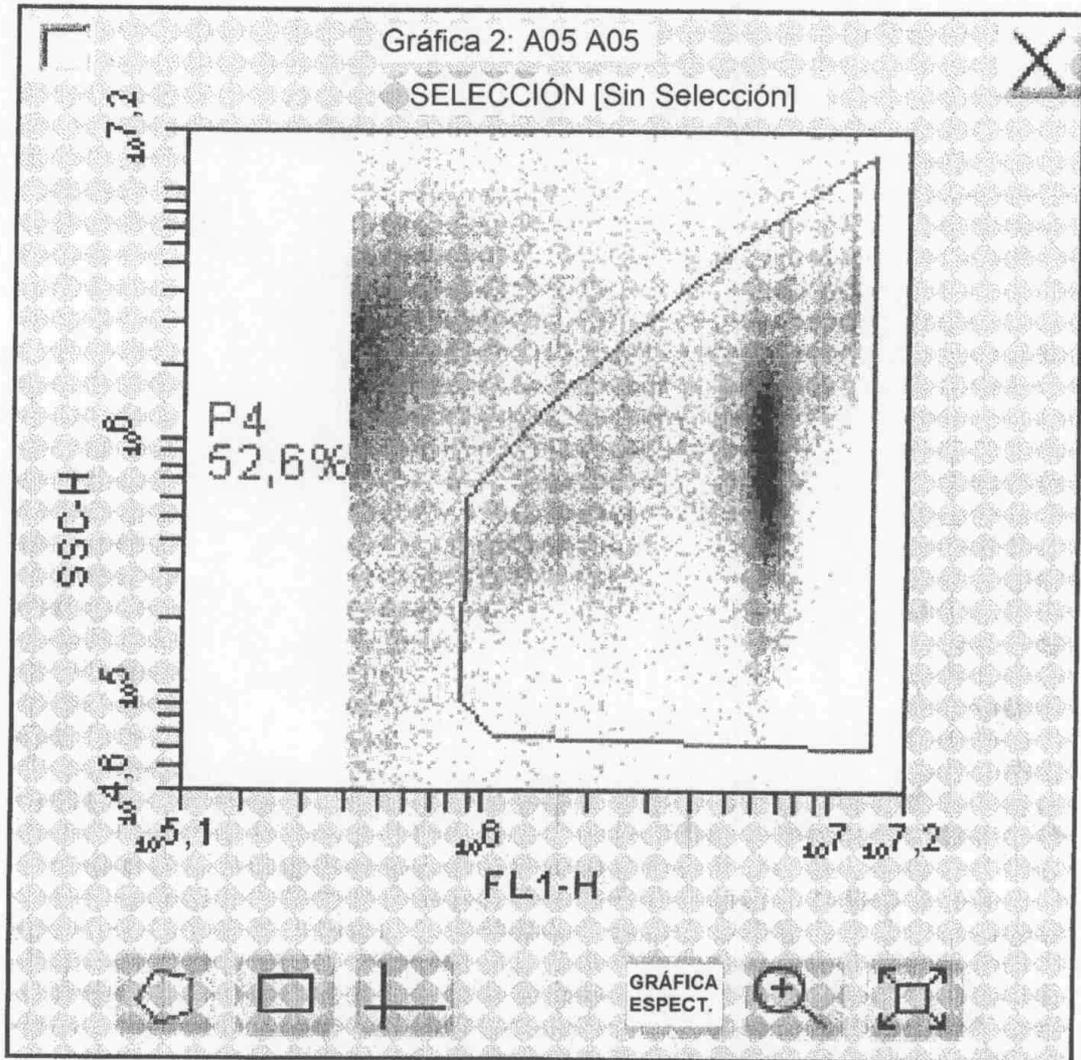
Tabla 2

1	50 µl de leche	50 µl de naranja de acridina		100 µl de PBS
2	90 µl de leche	10 µl de naranja de acridina		
3	99 µl de leche	2 µl de naranja de acridina		100 µl de PBS
4	50 µl de leche	50 µl de naranja de acridina	10 µl de EDTA	
5	90 µl de leche	10 µl de naranja de acridina	10 µl de EDTA	100 µl de PBS
6	99µl de leche	2 µl de naranja de acridina	10 µl de EDTA	
7	50 µl de leche	50 µl de naranja de acridina		
8	90 µl de leche	10 µl de naranja de acridina		100 µl de PBS
9	99µl de leche	2 µl de naranja de acridina		
10	50 µl de leche	50 µl de naranja de acridina	10 µl de EDTA	100 µl de PBS
11	90 µl de leche	10 µl de naranja de acridina	10 µl de EDTA	
12	99µl de leche	2 µl de naranja de acridina	10 µl de EDTA	100 µl de PBS

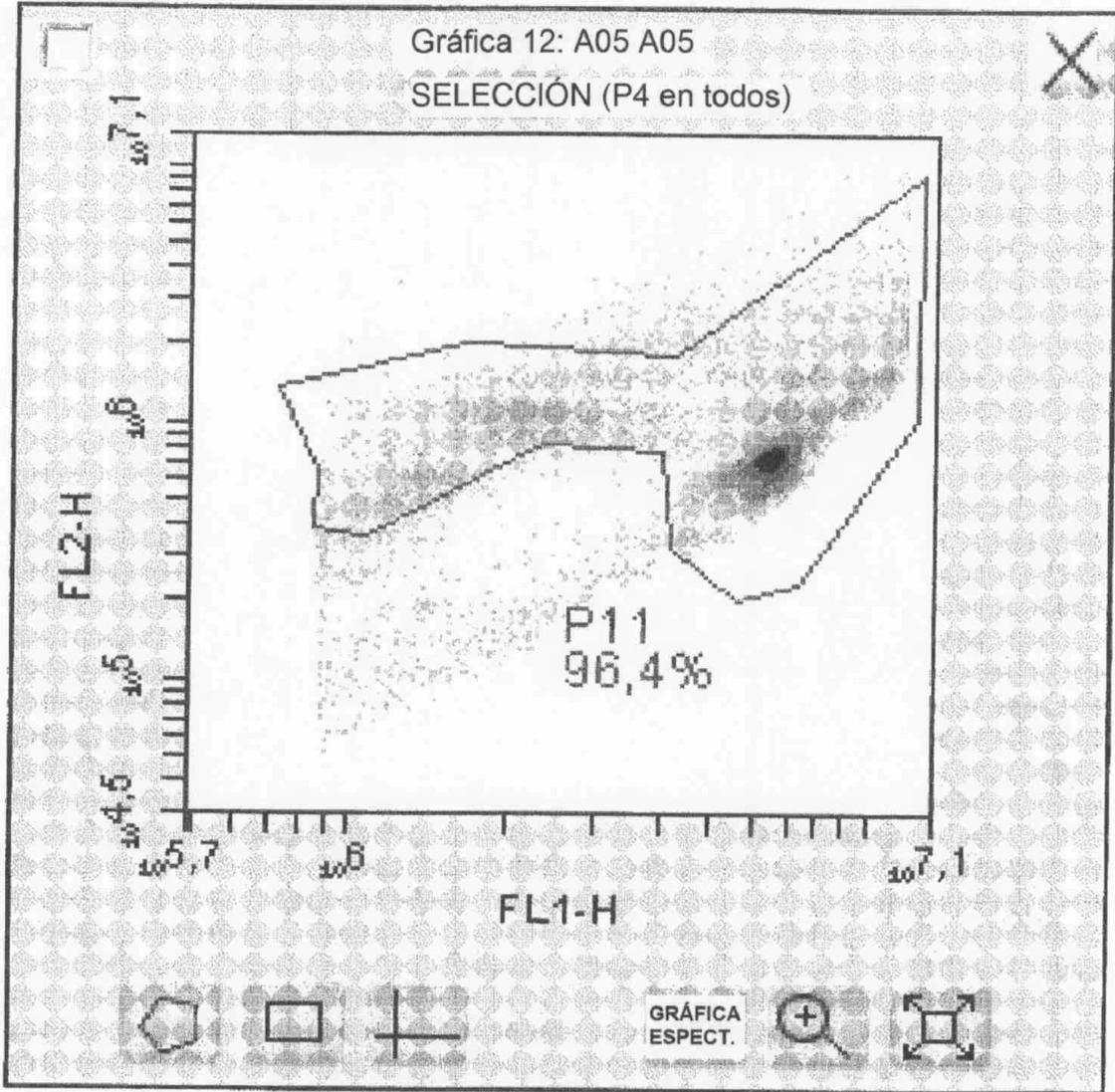
- 5 Después de reaccionar durante 1 a 2 minutos a temperatura ambiente, cada combinación se mide en el citómetro de flujo estándar usado en los ejemplos 1 y 2 básicamente de la forma descrita en los ejemplos 1 y 2 anteriores. En el citómetro de flujo la muestra se mide con una velocidad de 14 µl/min y se estimula con láser azul (488 nm). Se usó un valor de FL1-H de 400.000 como señal de activación. Se usaron señales fluorescentes (FL1-H, FL2-) y señales de dispersión de luz (dispersión lateral, SSC-H).
- 10 Para el análisis de los datos, se representa gráficamente la fluorescencia de color rojo frente a verde (FL2-H frente a FL1-H) y los resultados se ilustran en la figura 5. Al usar 2 µl de 10 µl de naranja de acridina se observa únicamente una población de células en las gráficas (figura 6), es decir, las concentraciones bajas de naranja de acridina no proporcionan diferenciación suficiente. A diferencia de esto, se observan varias poblaciones en la gráfica al usar 50 µl de naranja de acridina (véase la figura 5).
- 15 Cuando se combina la concentración elevada de naranja de acridina con EDTA, la población muy densa se desplaza hacia la derecha, es decir, las intensidades de fluorescencia verde de estas células aumentan (figura 7) en comparación con lo que se ilustra en la figura 5.
- 20 La adición de PBS a la muestra disminuye el nivel de interferencia, es decir, como se muestra en la figura 8 y la figura 9, es más fácil separar las células de la interferencia. La interferencia es la población en forma de cuña en la parte izquierda de las gráficas. En la gráfica de la figura 8 (la muestra sin PBS), la población de interferencia se superpone a una de las poblaciones celulares. En la gráfica de la figura 9 (la muestra sin PBS), la población de interferencia se separa mejor de una de las poblaciones celulares.
- 25 De esto puede concluirse que las concentraciones de naranja de acridina mayores de aproximadamente 0,2 mg/ml proporcionan una diferenciación adecuada. La cantidad de reactivo (ya sea como un único reactivo o reactivos individuales añadidos de forma separada) que puede añadirse a la muestra sin causar efectos de dilución no deseados puede determinarse mediante la consideración de un rendimiento global óptimo para un sistema que emplea el presente método en el análisis de rutina. Esta cantidad debe proporcionar una dilución menor de 1:200, preferentemente menor de 1:50 y más preferentemente menor de 1:5.
- 30 A pesar de que esta determinación experimental se ilustra con referencia al naranja de acridina, se apreciará que después de una serie de mediciones, podrá esperarse de forma razonable que el experto en la técnica determine un intervalo adecuado de marcador de diferenciación a emplear en el método de acuerdo con la presente invención. Se apreciará adicionalmente que, mientras el método se ha descrito con respecto a las mediciones de citometría de flujo de intensidades fluorescentes relativas como una medición de diferenciación para las células, pueden emplearse otras mediciones de diferenciación que dependan de la naturaleza del marcador de diferenciación empleado.
- 40

REIVINDICACIONES

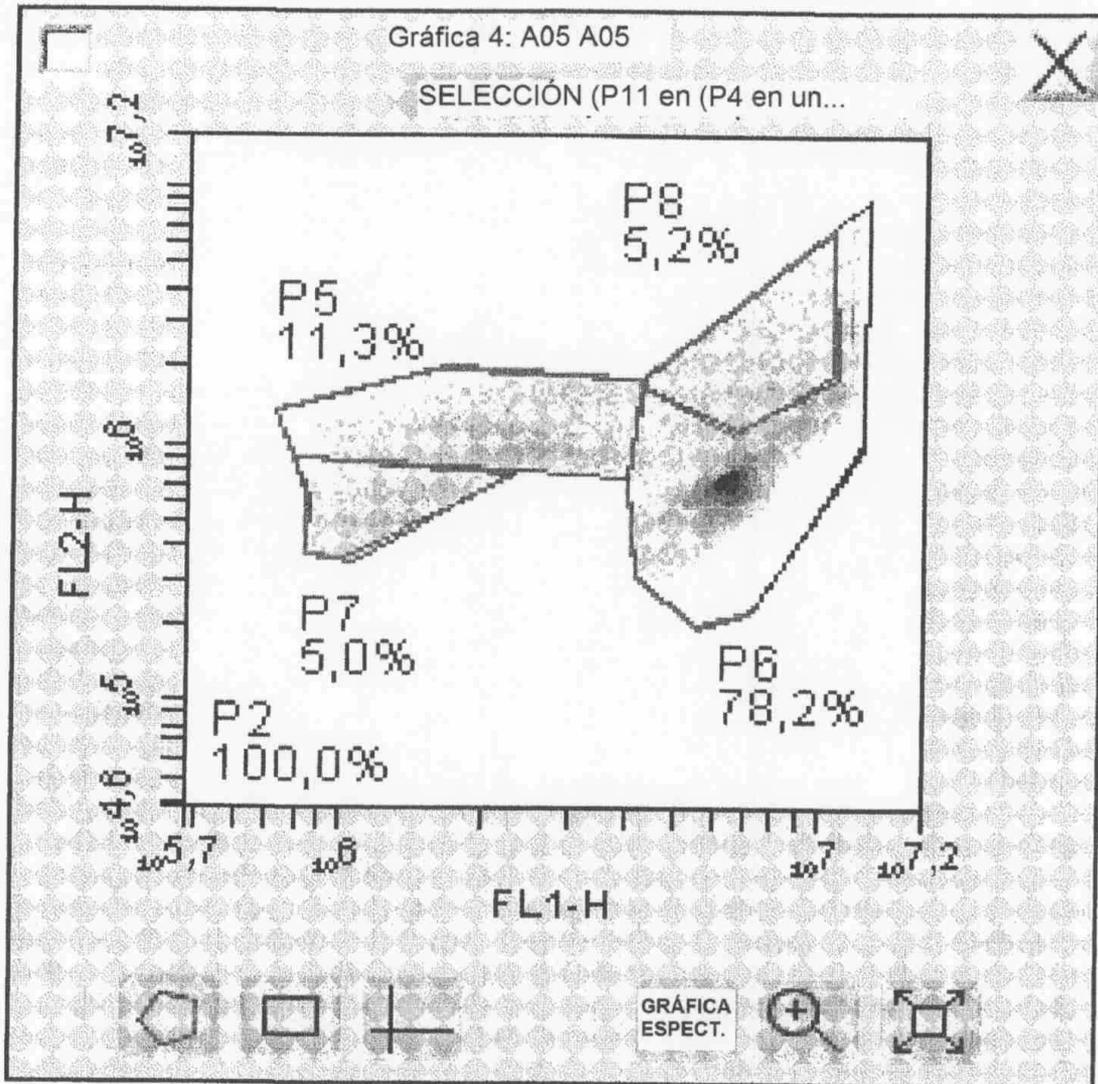
1. Un método para determinar un grado de infección de mastitis que comprende las etapas de
- 5 i) preparar una muestra sin aislar de leche de mamífero en la que las células somáticas no están aisladas de las partículas de interferencia en la leche de mamífero añadiendo un reactivo que comprende un marcador de diferenciación de tinción meta-cromática, en una cantidad suficiente para proporcionar una diferenciación entre los tipos de células en la leche de mamífero en una proporción de dilución de menos de 1:200;
- 10 ii) medir un recuento celular para cada uno de uno o más tipos de leucocitos de células somáticas seleccionadas del grupo de tipo linfocitos, monocitos, macrófagos y polimorfonucleares de leucocitos diferenciados por el marcador en la muestra a través de un citómetro de flujo que tiene un sistema de detección sensible a las diferencias en el marcador de diferenciación resultantes de la asociación diferencial del marcador con los diferentes tipos de células en la muestra; y
- 15 iii) determinar una indicación de un grado de infección de mastitis en función del porcentaje de tipo polimorfonucleares de leucocitos en el número total de células medidas como un recuento celular medido comparando el recuento celular medido con uno o más valores de referencia, cada uno predeterminado para asociarse a uno o más grados de infección.
- 20 2. Un método como se ha indicado en la reivindicación 1, **caracterizado por que** tiene una etapa adicional para la medición de un recuento total de células somáticas y **por que** la etapa para determinar una indicación comprende adicionalmente comparar el recuento total de células somáticas medido con uno o más valores de referencia, cada uno predeterminado para asociarse a uno o más grados de infección de mastitis.
- 25 3. Un método como se ha indicado en cualquier reivindicación anterior, **caracterizado por que** la leche de mamífero es leche bovina y **por que** la determinación de una indicación de un grado de infección de mastitis comprende determinar una indicación de la presencia y el grado de mastitis, o de ambos.
- 30 4. Un método como se ha indicado en la reivindicación 3, **caracterizado por que** la indicación de mastitis comprende una indicación de mastitis subclínica.
5. Un método como se ha indicado en la reivindicación 3 o la reivindicación 4, **caracterizado por que** se determina un grado de infección de mastitis que indica la probabilidad de desarrollar mastitis clínica.
- 35 6. Un método como se ha indicado en la reivindicación 6, **caracterizado por que** el tinte metacromático es naranja de acridina en una concentración mayor de 0,2 mg/ml.



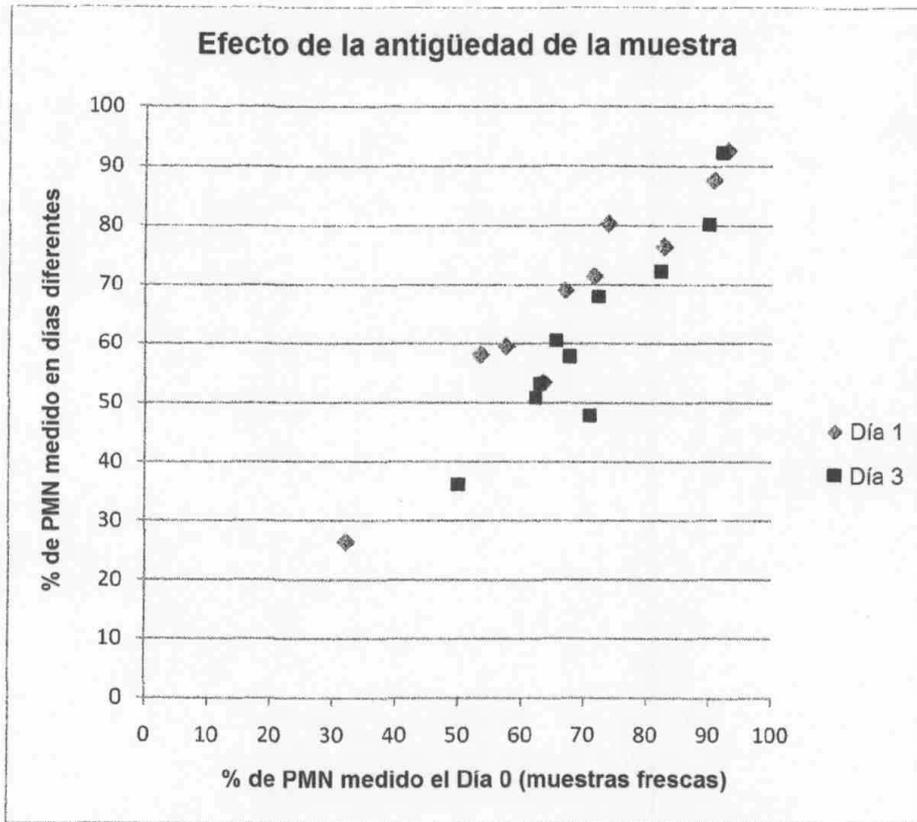
**FIG. 1**



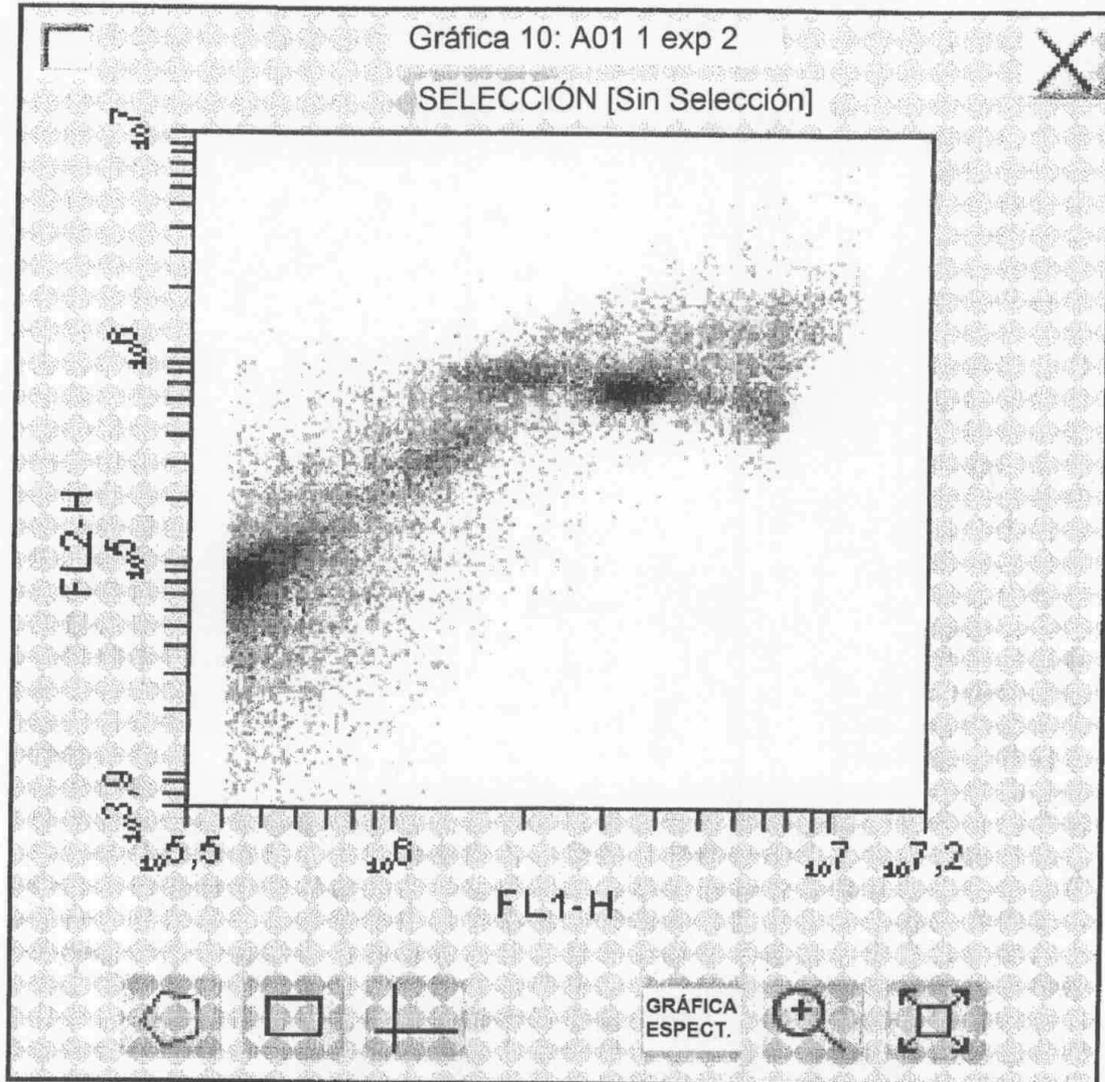
**FIG. 2**



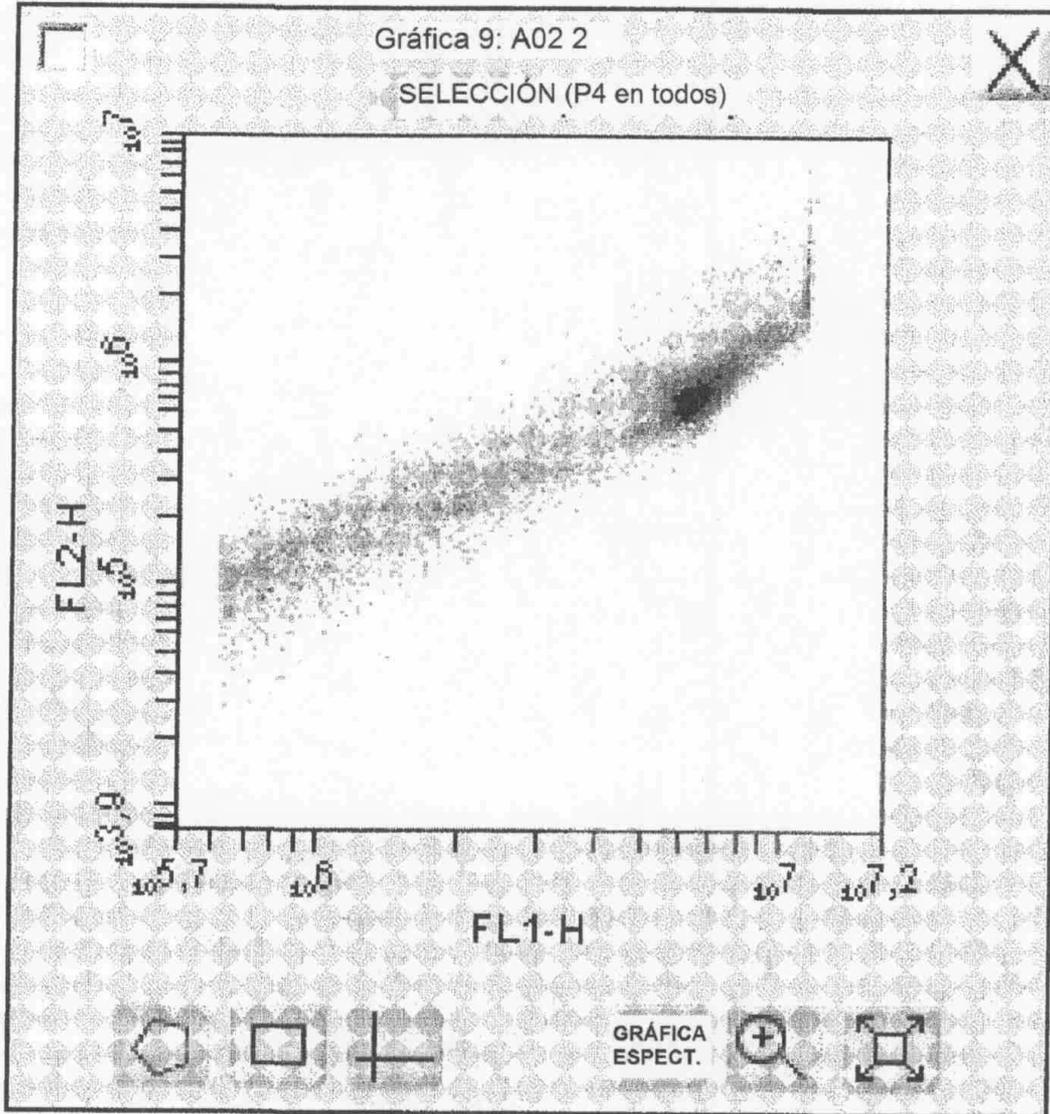
**FIG. 3**



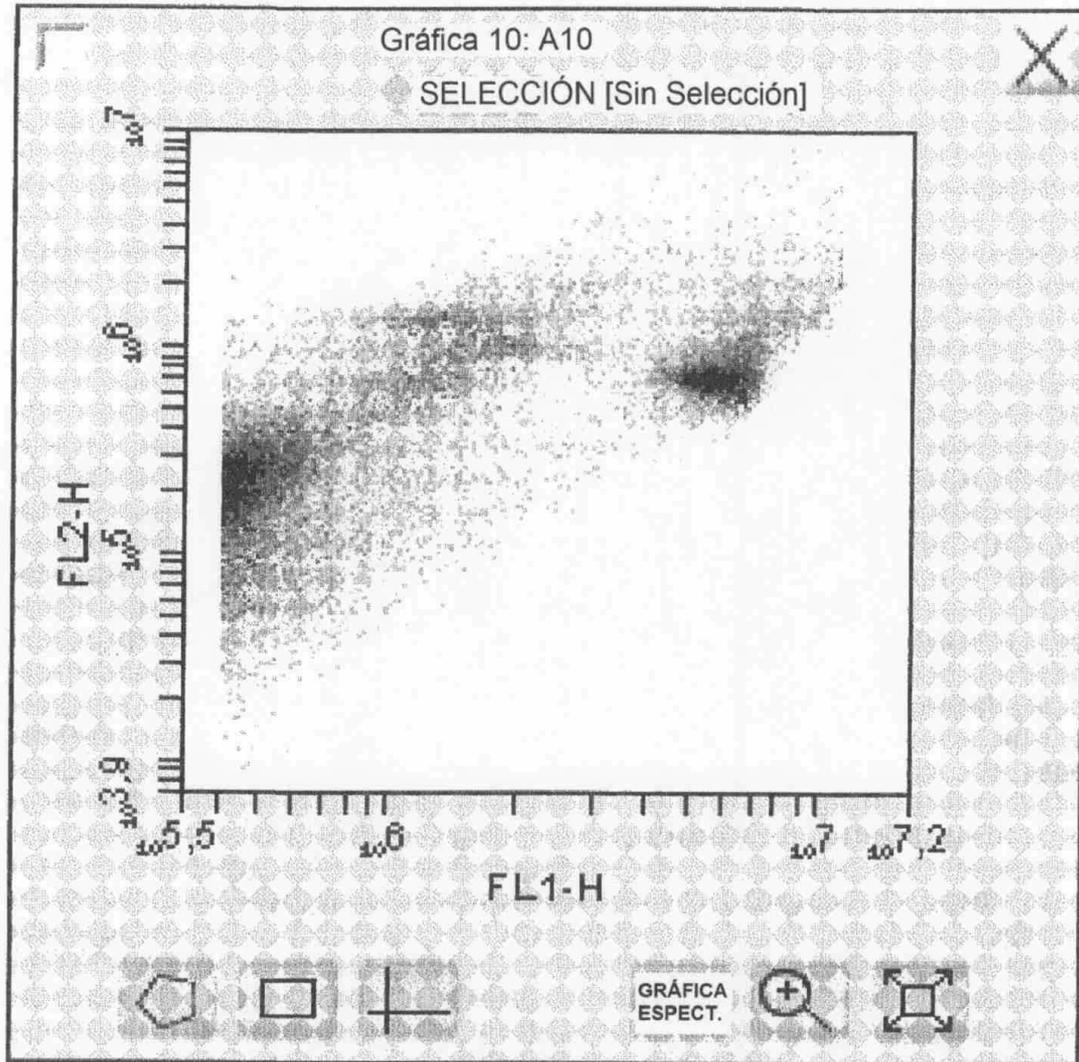
**FIG. 4**



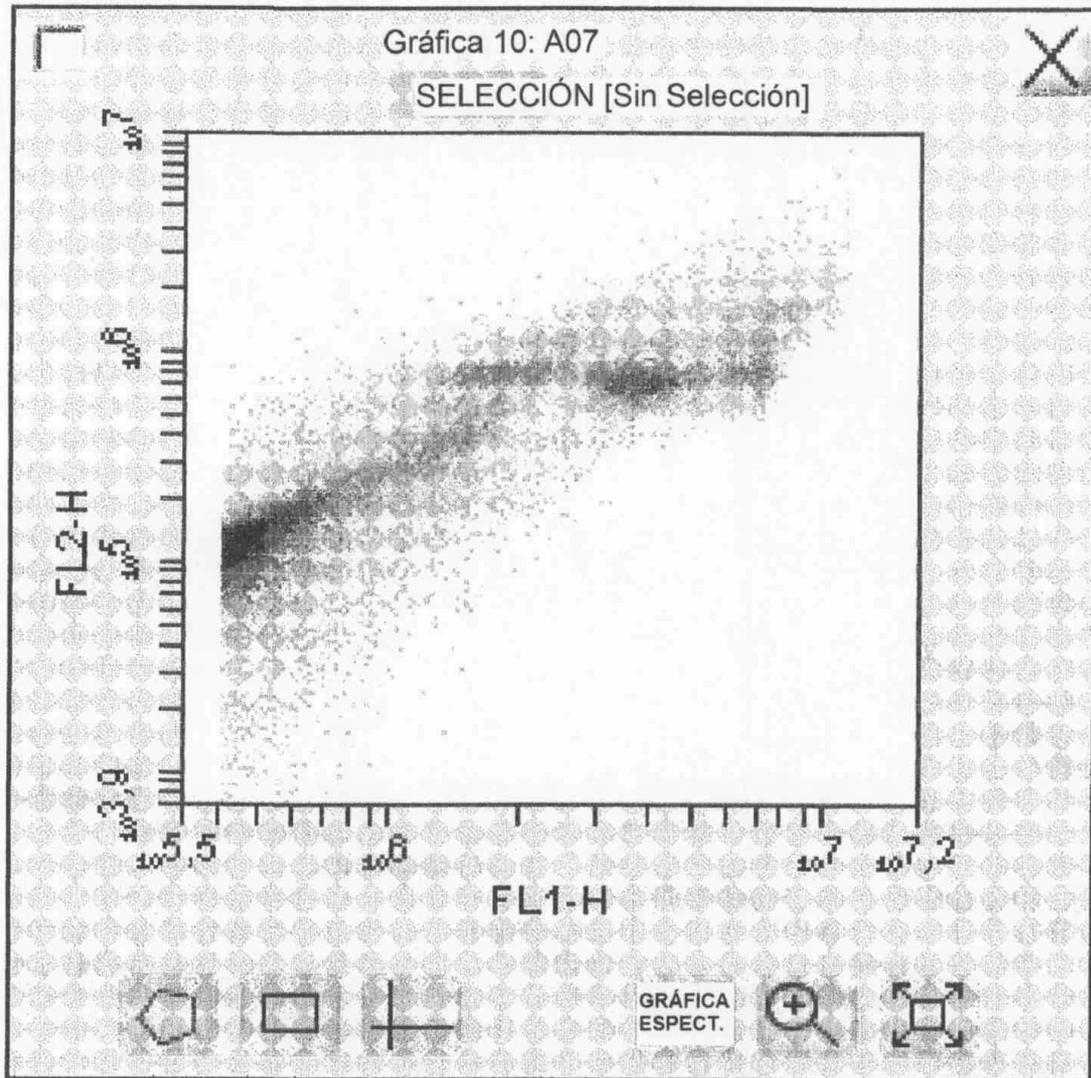
**FIG. 5**



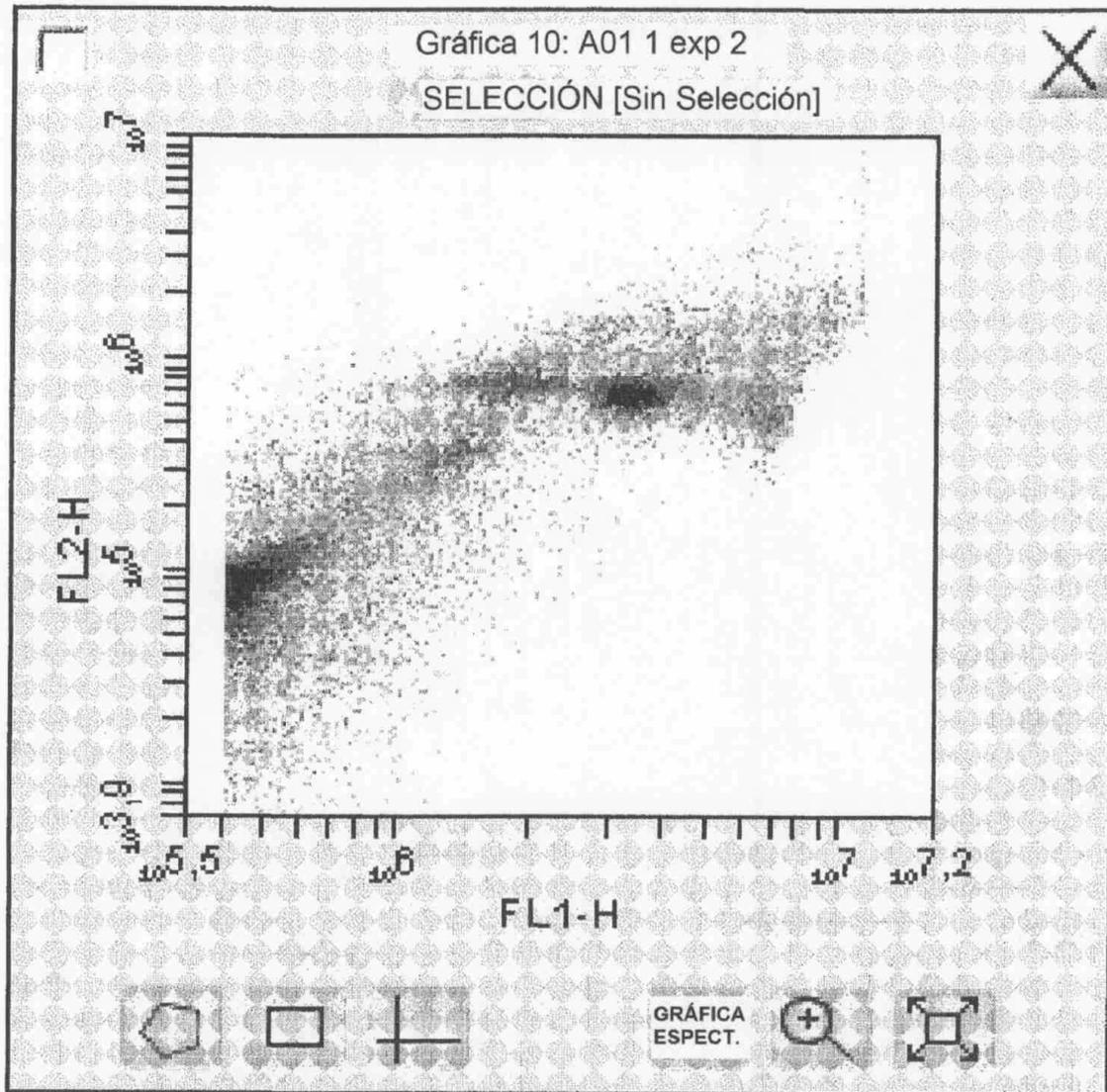
**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG. 8**



**FIG. 9**