

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. Juni 2012 (28.06.2012)

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/02 (2006.01) G01N 15/14 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/073428

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Dezember 2011 (20.12.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2010 064 131.6
23. Dezember 2010 (23.12.2010) DE
10 2011 003 101.4
25. Januar 2011 (25.01.2011) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VAN DEN BOOGAART, Jan [NL/NL]; Tuinstraat 29, NL-5711AG Someren (NL). HAYDEN, Oliver [AT/DE]; Dachsweg 4 a, 91074 Herzogenaurach (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT; Postfach 22 16 34, 80506 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

(54) Titel: METHOD FOR DETECTING A PLASMODIUM INFECTION

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUM NACHWEIS EINER PLASMODIENINFektION

FIG 1

The diagram illustrates a optical system for blood analysis. A sample tube 3 is held between two lenses 4. Light from the sample tube passes through the lenses and is focused by lens 5 onto a linear array of detectors 10. The array 10 is mounted on a frame 8, which is connected to a base 9. A circular inset provides a detailed view of a single cell being analyzed by the detector array.

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting a plasmodium infection in a patient blood sample, wherein a differential analysis of the polymorphonuclear neutrophilic granulocytes in the sample is carried out and the distribution of the cell volume and of the cell density, the thrombocyte count in the sample, and the distribution of the cell density of the thrombocytes in the sample are determined.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer Plasmodieninfektion in einer Patientenblutprobe, wobei eine Differentialanalyse der polymorphekernigen neutrophilen Granulozyten in der Probe durchgeführt wird und die Verteilung des Zellvolumens und der Zeldichte, die Thrombozytenanzahl in der Probe, sowie die Verteilung der Zeldichte der Thrombozyten in der Probe bestimmt werden.

WO 2012/084963 A1

Beschreibung

Verfahren zum Nachweis einer Plasmodieninfektion

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer Plasmodieninfektion in einer Patientenblutprobe.

Plasmodieninfektionen, wie beispielsweise die durch die Erreger *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* sowie *Plasmodium knowlesi* hervorgerufenen Malariaerkrankungen, sind weltweit Ursache für Hunderte von Millionen Neuerkrankungen pro Jahr. Nach Zahlen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird mit jährlichen Neuerkrankungen im Bereich von 300 bis 500 Millionen Personen gerechnet.

Im Hinblick auf die zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber den existierenden Arzneistoffen zur Behandlung von Plasmodieninfektionen besteht daher ein zunehmender Bedarf an zuverlässigen, preisgünstigen und rasch durchführbaren diagnostischen Verfahren, die zudem falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse weitestgehend ausschließen können. Beispielsweise wären in Regionen mit einer niedrigen Prävalenz von Malariainfektionen, hochsensitive diagnostische Verfahren erforderlich, um die wenigen Erkrankten auch als solche zu erkennen.

Hingegen besteht in den Weltregionen mit hoher Prävalenz / Inzidenz, die üblicherweise auch zu den ärmeren Regionen der Welt zählen, ein hoher Bedarf an Testverfahren mit einer hohen Spezifität, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen (d.h. Gesunde auch als gesund zu erkennen).

In der Regel besteht zudem das Problem, dass nicht nur eine extrem hohe Anzahl an Patientenproben untersucht werden muss, sondern dass dies - wie oben angesprochen - auch rasch erfolgen muss. Denn die Ergebnisse der Diagnose sollten innerhalb

weniger als 2 Stunden verfügbar sein. Falls dies nicht möglich ist, muss der Patient möglicherweise auf Grundlage einer oberflächlichen, klinischen Bewertung behandelt werden.

- 5 Die Folgen einer fehlerhaften oder falsch-negativen/falsch-positiven Malaria-diagnose sind vielfältig: bei einer falsch-positiven Diagnose kann der (sinnlose) Einsatz von Arzneimitteln vermeidbare Nebenwirkungen mit sich bringen, ganz abgesehen von der finanziellen Belastung für das Gesundheitssystem, sowie der Möglichkeit einer Resistenzbildung durch die Plasmodien. In einer Studie aus dem Jahre 2006 wurde geschlussfolgert, dass ein diagnostischer Test mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 95 %, der nur minimale Infrastruktur benötigt, mehr als 100.000 Todesfälle und mehr als 400 Millionen unnötige Behandlungen ersparen könnte (Rafael ME, Taylor T, Magill A et al. Reducing the burden of childhood malaria in Africa: The role of improved diagnosis. *Nature*. 2006; 444 (suppl 1): 39 - 48)
- 20 In der Praxis ergibt sich ein Hauptproblem bei der Diagnose von Parasitenerkrankungen, beispielsweise Malaria, dadurch, dass die Labordiagnose erst dann erfolgt, wenn ein klinischer Verdacht auftritt, dass der Patient tatsächlich unter einer derartigen Infektion leidet. Dies kann insbesondere in Regionen mit einer niedrigen Prävalenz / Inzidenz dazu führen, dass erkrankte Personen nicht oder nicht rechtzeitig behandelt werden. Beispielsweise wurde in einer kanadischen Studie (Kain et al, 1998, *Clinics in Infectious Diseases* 27, 142 - 149) berichtet, dass bei 59 % aller mit Malaria infizierten zurückkehrenden Reisenden anfänglich nicht die richtige Diagnose gestellt wurde. Im Schnitt vergingen 7,6 Tage vor Stellung der richtigen Diagnose und vor Therapiebeginn für *Plasmodium falciparum* und 5,1 Tage für *Plasmodium vivax*. Derartige Verzögerungen können zu bedeutenden Komplikationen und zu einer erhöhten Mortalitätsrate führen (Humare et al, 1997, *Canadian Medical Association Journal* 156, 1165 - 1167).

Zur Diagnose von Plasmodieninfektionen stehen mehrere Verfahren zur Verfügung: das sicherste Verfahren besteht in einer mikroskopischen Blutuntersuchung, jedoch ist dieses Verfahren personal-, zeit-, und geräteaufwändig. Mit den gängigen mikroskopischen Verfahren kann das geschulte Fachpersonal die Art und das Stadium der Infektion zuverlässig bestimmen.

Daneben existieren die sogenannten raschen diagnostischen Tests (Rapid Diagnostic Test = RDT). Beispielsweise werden hier monoklonale Antikörper zum Nachweis von Parasitenantigenen verwendet. Dieser Test wird üblicherweise eingesetzt, um *Plasmodium falciparum*-Infektionen zu erkennen.

Ein deutlich sensitiveres Verfahren für die Malaria-Diagnostik besteht in der Polymerase-Kettenreaktion, die jedoch aufgrund des hohen Material- und Zeitaufwands für den Akutfall wenig geeignet ist.

Zur Gruppe der Rapid Diagnostic Tests (RDT) zählen mittlerweile auch automatisierte Verfahren, die sich aufgrund ihres hohen Durchsatzes für flächendeckende Nachweisverfahren hervorragend eignen. Siehe hierzu 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* [1999, 5(6): 836-838].

Zur automatisierten Anwendung werden so genannte "automated cell counters" (Automatisierte Zellzählgeräte) mit zunehmendem Erfolg angewendet. Beispiele hierfür sind das Advia 2120, Sysmex XE-2100 sowie Cellavision DM96 Gerät. Diese automatisierten Geräte stellen, abgesehen von ihrer hohen Durchsatzzahl, einige Vorteile bereit, wie beispielsweise hohe Objektivität (keine Variabilität abhängig vom Beobachter), Elimination statistischer Variationen, die üblicherweise mit einer manuellen Zählung verbunden sind (Zählung hoher Zellzahlen), sowie die Bestimmung zahlreicher Parameter, die bei einer ma-

nuellen Auszählung nicht verfügbar wären und, wie angesprochen eine effizientere und kosteneffektivere Handhabung.

Einige dieser Geräte können 120 bis 150 Patientenproben pro Stunde bearbeiten.

5

Die technischen Prinzipien der automatischen Einzelzellzählung beruhen entweder auf einer Impedanz- (Widerstands-) Messung oder auf einem optischen System (Streulicht- oder Absorptionsmessung).

10

Beim Impedanzverfahren erfolgt die Zellzählung sowie deren Größenbestimmung auf Grundlage des Nachweises und der Messung von Veränderungen in der elektrischen Leitfähigkeit (Widerstand), die durch ein Teilchen verursacht werden, das sich durch eine kleine Öffnung hindurchbewegt. Teilchen, wie beispielsweise Blutzellen, sind selbst nicht leitend, werden jedoch in einem elektrisch leitenden Verdünnungsmittel suspenziert. Wenn eine derartige Suspension von Zellen durch eine Öffnung hindurchgeleitet wird, nimmt bei Durchgang einer einzelnen individuellen Zelle die Impedanz (Widerstand) des elektrischen Weges zwischen den beiden Elektroden, die sich auf jeder Seite der Öffnung befinden, vorübergehend zu.

15

Beispielsweise wird in WO 2005/088301 ein Verfahren zum Nachweis von Malaria und anderen Parasiteninfektionen mittels einer derartigen Impedanzmessung (siehe experimenteller Teil) sowie im Artikel "Development of an Automated Malaria Discriminant Factor Using VCS Technology", Briggs C et al. Am J Clin Pathol 2006, beschrieben.

20

Im Gegensatz zum Impedanzverfahren umfasst das optische Verfahren das Durchleiten eines Laserlichtstrahles durch eine verdünnte Blutprobe, die in einem kontinuierlichen Strom von dem Laserstrahl erfasst wird. Jede Zelle, die durch die Erfassungszone der Durchflusszelle hindurchtritt streut das fokussierte Licht. Das gestreute Licht wird dann durch einen Fotodetektor nachgewiesen und in einen elektrischen Impuls

umgewandelt. Die hier erzeugte Anzahl von Impulsen ist direkt zur Zellanzahl proportional, die durch die Erfassungszone in einer speziellen Zeitspanne hindurchtritt.

- 5 Bei den optischen Verfahren wird die Lichtstreuung der einzelnen Zelle, die durch die Erfassungszone hindurchtritt, in verschiedenen Winkeln gemessen. Hierdurch werden Informationen über Zellstruktur, Form und Reflexionsvermögen erfasst. Diese Eigenschaften können dazu verwendet werden, verschiedene Arten von Blutzellen zu differenzieren und die abgeleiteten Parameter zur Diagnose von Abweichungen der Blutzellen 10 von der Norm zu verwenden.

Die durch beide Messverfahren erzielten Werte werden mittels 15 der Differentialdiagnostik zu einem aussagekräftigen Diagnoseresultat verknüpft.

Die Sensitivität und Spezifität von diagnostischen Verfahren spielt im Rahmen der Differentialdiagnostik eine tragende 20 Rolle, dementsprechend wird fortwährend an einer Verbesserung dieser Eigenschaften gearbeitet.

Beispielsweise werden in WO 2005/088301 die Messwerte bezüglich des Zellvolumens von Lymphozyten und Monozyten erfasst 25 und als Parameter für eine Malariaerkrankung herangezogen. Genauer gesagt wird hier die Standardabweichung des Volumens der Monozyten- und Lymphozytenpopulationen bewertet, d.h. deren Heterogenität. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass dieser Parameter für die Diagnose einer Parasiteninfektion 30 nicht spezifisch genug ist, da es auch bei jeder anderen Infektionskrankheit (beispielsweise Erkältungen) zu einer Volumenveränderung der Lymphozyten und Monozyten kommen kann. Darüber hinaus haben sich Impedanzmessungen von Blutproben als fehleranfällig erwiesen, z.B. können Messergebnisse (beispielsweise durch variiierende Viskosität der zu testenden 35 Suspension) verfälscht werden.

In ähnlicher Weise wird in "Development of Automated Malaria Discriminant Factor Using VCS Technology" (s.o.) beschrieben, dass die Standardabweichung des Volumens von Lymphozyten und Monozyten signifikant vom Normwert abweicht, wenn eine Malariainfektion vorliegt.

Eine beispielhafte Darstellung verschiedener Sensitivitäten und Spezifitäten unter Verwendung automatisierter Bluttestgeräte findet sich in Tabelle 3, wonach die Sensitivität teilweise nur 48,6 bzw. 52 % beträgt. Damit gelingt es mit den gängigen Testmethoden nicht im ausreichendem Maße, Verfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität bereitzustellen, d.h. Verfahren zum Nachweis einer Plasmodieninfektion, die einen erkrankten Patienten auch als solchen erkennen, sowie andererseits einen gesunden Patienten als gesund erkennen können.

Nach neueren Untersuchungen ist die Aussagekraft der bestehenden automatisierten Testsysteme (und damit auch der angegebenen Sensitivitäten /Spezifitäten) zudem fraglich und lässt Spielraum für Verbesserungen zu. Siehe hierzu das kürzlich veröffentlichte Paper "Automated haematology analysis to diagnose malaria", *Malaria Journal* 2010, 9:346.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Nachweis einer Plasmodieninfektion in einer Blutprobe bereit zu stellen, das Testergebnisse mit hoher Sensitivität und Spezifität ergibt. Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein Nachweisverfahren für Malariainfektionen bereit zu stellen, das durch den Einsatz mehrerer unabhängiger Parameter eine hohe Spezifität und Sensitivität für Malaria unabhängig von anderen Infektionen oder unterschiedlichem Gesundheitszustand der Patienten erlaubt. Es ist eine noch weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein solches Verfahren bereitzustellen, das mit Hilfe automatisierter Blutanalysegeräte durchgeführt werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren mit den in Patentanspruch 1 angegebenen Merkmalen gelöst.

Die Erfindung schafft ein Verfahren zum Nachweis einer Plasmoidieninfektion in einer Patientenblutprobe, umfassend

- 5 a) Durchführen einer Differentialanalyse der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in der Probe und Bestimmen der Verteilung des Zellvolumens und der Zelldichte;
- 10 b) Bestimmen der Thrombozytenanzahl in der Probe;
- 15 c) Bestimmen der Verteilung der Zelldichte der Thrombozyten in der Probe;
- d) Gewinnen von Probenparametern aus den in a) bis c) durchgeführten Bestimmungen; und
- 20 e) Bewerten der Parameter gegenüber einem vorherbestimmten Kriterium, wobei bei Erfüllung des Kriteriums eine Plasmoidieninfektion vorliegt.

Bei der erfindungsgemäß untersuchten Patientenblutprobe handelt es sich in der Regel um eine humane Blutprobe. Es ist jedoch auch möglich, Blutproben von Säugetieren zu untersuchen.

Der Begriff "Differentialanalyse" wie hierin verwendet bedeutet die Erfassung mehrerer messbarer Einzelwerte der Bestandteile der Patientenblutprobe, die letztendlich für die durchzuführende Diagnose kombiniert ausgewertet werden.

In Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird hierzu zunächst eine Differentialanalyse der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in der Probe bezüglich der Bestimmung der Verteilung des Zellvolumens und der Zelldichte durchgeführt. Dies schließt jedoch nicht aus, dass weitere

Leukozytenarten, beispielsweise eosinophile oder basophile Granulozyten ebenfalls in die Untersuchung mit eingeschlossen werden.

5 Eine Abweichung der Verteilung des Zellvolumens sowie der Zelldichte von der Norm weisen in der Regel auf einen pathologischen Zustand hin. Im vorliegenden Fall weisen gegenüber den üblicherweise gemessenen Normalwerten niedrigere Werte auf eine Plasmodieninfektion hin. Die mit der Plasmodieninfektion einhergehende Verringerung des Zellvolumens sowie der Zelldichte ist mit den im Zuge der Infektion auftretenden Verteidigungsmechanismen der Leukozyten zu erklären. Beispielsweise wandern neutrophile Granulozyten aus dem Blutgefäß in das Gewebe ein, sezernieren dort proteolytische Enzyme um interzelluläre Verbindungen zu lösen und phagozytieren dort Bakterien. Hierdurch kommt es zu einer Veränderung des Zellvolumens und der Zelldichte.

20 Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, dass die Sensitivität und Spezifität des Nachweisverfahrens für eine Plasmodieninfektion deutlich erhöht werden kann, wenn neben den oben beschriebenen Bestimmungen (d.h. sequentiell oder gleichzeitig) sowohl die Thrombozytenanzahl in der Patientenblutprobe als auch die Verteilung der Zelldichte der Thrombozyten in der Probe bestimmt wird. Auch hier ist ein von der Norm nach unten abweichender Wert prädiktiv für das Vorliegen einer Plasmodieninfektion. Dies führt erfindungsgemäß zu einer gegenüber bestehenden Verfahren deutlich erhöhten Sensitivität und Spezifität des Nachweisverfahrens.

30 Aus den in den Schritten a) bis c) erzielten Messergebnissen werden Probenparameter gewonnen und gegenüber einem vorherbestimmten Kriterium bewertet, wobei bei Erfüllung des Kriteriums eine Plasmodieninfektion vorliegt.

35 Bei Parametern handelt es sich um abgeleitete Größen, beispielsweise steht der Begriff Zellvolumenparameter für einen

mit der Zellvolumenverteilung in Beziehung stehenden Parameter wie beispielsweise das durchschnittliche Zellvolumen oder die Standardabweichung der Zellvolumenverteilung einer gegebenen Zellsubpopulation.

5

Der Begriff "vorherbestimmtes Kriterium" wie hierin verwendet betrifft ein Kriterium, das auf Grundlage einer oder mehrerer Probenparameter etabliert wurde, im Falle der vorliegenden Erfindung insbesondere aufgrund von Zellvolumenparametern, 10 Zellzahlparametern und Zelldichteparametern. Das Kriterium wird auf Grundlage eines Vergleichs von infizierten Blutproben mit entsprechenden Werten von normalen Blutproben bestimmt, beispielsweise wurden für die experimentellen Untersuchungen, die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegen ein 15 Vergleich von 204 *P. falciparum* infizierten Blutproben mit entsprechenden Werten von 3240 normalen Blutproben durchgeführt.

Durch Kombination und Bewertung von Probenparametern polymorphekerniger neutrophiler Granulozyten (Zellvolumen und 20 Zelldichte) und, zusätzlich, unter Heranziehung der Thrombozytenanzahl sowie der Verteilung der Zelldichte der Thrombozyten in der Probe, konnten erfindungsgemäß unerwartet hohe Werte für die Sensitivität und Spezifität des Nachweisverfahrens 25 erzielt werden. Wie in den Beispielen dargelegt wird, gelang es hierbei, Spezifitätswerte von 99 % und Sensitivitätswerte von 98 % erreichen. Dies bedeutet, dass bei flächendeckenden, automatisierten Blutuntersuchungen die Anzahl der falsch-positiven bzw. falsch-negativen Diagnoseergebnisse 30 in einem bisher nicht bekannten Maße reduziert werden konnte und beinahe vernachlässigt werden kann. Dies bedeutet einen großen Fortschritt in Hinblick auf eine gesicherte Plasmodieninfektionsdiagnose, insbesondere Malaria-Diagnose und wird 35 in Ländern, die von einer hohen Prävalenz / Inzidenz von Malariainfektionen betroffen sind zu einer deutlichen Verbesserung des Gesamtgesundheitszustandes über rechtzeitige und sinnvolle medizinische Maßnahmen führen.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Parameterbestimmung durch Streulichtmessung. Bei der Streulichtmessung handelt es sich, wie oben ausgeführt ("optisches Verfahren") im Gegensatz zur Impedanzmessung um ein Verfahren, bei dem Laserlicht verwendet wird, wobei die Blutproben (Zelle für Zelle) durch das Laserlicht geführt werden und die Ablenkung der Laserstrahlen durch eine geeignete Vorrichtung erfasst werden kann. Das unter Verwendung des Laserstrahls durchgeführte Verfahren ist in der beiliegenden Figur 1 erläutert. Hierbei werden die von einer individuellen Zelle gestreuten Lichtstrahlen in verschiedenen Winkelbereichen erfasst (niedriger Winkel / low angle und großer Winkel / high angle), die jeweils Hinweise auf Volumen (kleiner Winkel) sowie Dichte (großer Winkel) zulassen. Erfindungsgemäß wird als "kleiner Winkel" ein Winkel von ca. 2° bis 3° bezeichnet, als ein "großer Winkel" ein Winkel von ca. 5° bis 15° Abweichung von der Laserlichtachse. Es hat sich herausgestellt, dass die Streulichtmessung der Impedanzmessung im Hinblick auf die geringere Störanfälligkeit der Messergebnisse überlegen ist.

In einer Ausführungsform handelt es sich bei der Plasmodien-Infektion um eine Infektion mit P. ovale (Malaria tertiana), P. vivax (Malaria tertiana), P. malariae (Malaria quartana) oder P. falciparum (Malaria tropica). Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren kann für diese Plasmodieninfektionen gleichermaßen verwendet werden.

In einer Ausführungsform werden zusätzlich zu den oben genannten Verfahrensschritten zusätzlich eine Sphärisierung und Differentialanalyse der Retikulozyten und Erythrozyten in der Patientenblutprobe durch Streulichtmessung durchgeführt. Auch hier handelt es sich um eine Differentialanalyse, wobei die letztendlich zu bewertenden Parameter das Zellvolumen, die Zelldichte sowie den Hämoglobingehalt der Zellen und den Retikulozytenanteil betreffen. Bei Retikulozyten handelt es

sich um junge rote Blutkörperchen, die im Gegensatz zu den Erythrozyten selbst noch RNA enthalten und dadurch differenziert werden können.

5 Die Sphärisierung der Erythrozyten oder Retikulozyten ist notwendig, um die Blutzellen unabhängig von ihrer ursprünglichen Form in eine bei der Streulichtmessung auswertbare Form zu überführen. Zu diesem Zweck wird die Blutprobe mit einem Reagens versetzt, das zu einer Sphärisierung der Retikulozyten und Erythrozyten führt. Beispielhafte Reagenzien sind in US 5,045,472, US 5,284,771, US 5,633,167 sowie US 6,114,173 offenbart. Beispielsweise offenbart US 5,045,472 ein Reagenzgemisch umfassend eine isotonische wässrige Lösung, ein Sphärisierungsmittel (beispielsweise ein Detergens wie Alkalimetaallsalze eines Alkylsulfats) sowie ein Protein, das reversibel das Spärisierungsmittel bindet.

20 Durch Einbeziehung der Retikulozyten und Erythrozyten in das erfindungsgemäße Nachweisverfahren können Spezifität und Sensitivität weiter erhöht werden. Das Verhältnis von Retikulozyten zu Erythrozyten ist ein wichtiger Hinweis auf das Vorliegen einer Plasmodieninfektion im Blut. Je höher das Verhältnis der Retikulozyten, d.h. junger, unreifer Erythrozyten im Verhältnis zu reifen Erythrozyten ist, desto höher ist 25 die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Plasmodieninfektion.

30 In einer weiteren Ausführungsform wird nach einer Peroxidase-Einfärbung aller Leukozyten in der Blutprobe eine Differentialanalyse durch Streulichtmessung und Absorption durchgeführt.

35 Die Peroxidase-Einfärbung erfolgt üblicherweise durch zelluläre Peroxidase-Aktivität nach Umsetzung mit 4-Chlor-1-Naphtol. 4-Chlor-1-Naphtol dient hier als Substrat, das es Wasserstoffperoxyd ermöglicht, ein dunkles Präzipitat an endogenen Orten der Peroxidase-Aktivität in den Granula der

Leukozyten zu bilden. Bei einer Streulichtmessung werden dann die Zellen mit einer geringen oder moderaten Peroxidase-Aktivität weniger Licht absorbieren, während Zellen mit einer hohen Peroxidase-Aktivität mehr Licht absorbieren werden.

5

In einer weiteren Ausführungsform werden zusätzlich nach einer Peroxidase-Einfärbung, wie vorher geschildert, die Volumenverteilung der neutrophilen Granulozyten gemessen. Auch hier gilt, dass, je größer die Volumenverteilung der neutrophilen Granulozyten ist, desto größer die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Plasmodieninfektion in der Patientenblutprobe ist.

10 In einer weiteren Ausführungsform wird zusätzlich als Parameter die Standardabweichung der Volumenverteilung aller Leukozyten nach Peroxidase-Einfärbung verwendet. Je größer die Standardabweichung der Volumenverteilung aller Leukozyten ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Plasmodieninfektion.

15

20 Bei einer Ausführungsform wird die Bestimmung in a), d.h. die Durchführung einer Differentialanalyse der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in der Probe nach Lysieren wenigstens der eosinophilen und neutrophilen, nicht jedoch der basophilen Leukozyten (BASO Lysereagenz), durch ein geeignetes Lysereagenz durchgeführt. Auch hier ist das Vorliegen einer breiten Volumen- bzw. Dichteverteilung ein Indiz für das Vorliegen einer Plasmodieninfektion. Als Lysereagenz haben sich hier Gemische auf Basis von Phthalsäure und Detergenzien als vorteilhaft herausgestellt, beispielsweise kann ein derartiges Reagenz Salzsäure, Phthalsäure, ein Tensid sowie wahlweise ein Konservierungsmittel enthalten. Das Verhältnis von Phthalsäure und Salzsäure ist hierbei ungefähr 2,5:1 (basierend auf ihrer Konzentration in mmol/l. Durch dieses Reagenz werden die roten Blutkörperchen, die Thrombozyten, sowie alle Leukozyten (außer den basophilen Granulozyten) lysiert. Auch

durch dieses zusätzliche Verfahren kann der Plasmodien-spezifische Vorhersagewert erhöht werden.

In einer weiteren Ausführungsform wird nach einer spezifischen Lyse aller Zellen außer der basophilen Leukozyten der unspezifische Anteil aus dem Streulichtdiagramm (Klein- und Großwinkelstreuung) bestimmt wird. Je höher dieser Anteil ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Plasmodieninfektion vorliegt.

10

Die im erfindungsgemäßen Nachweisverfahren durchgeführten Bestimmungen a), b) und c) sind, wie oben ausgeführt, prädiktiv für das Vorliegen einer Plasmodieninfektion. Der Begriff "niedrige" Werte im Kontext der vorliegenden Erfindung bedeutet einen niedrigeren Wert der im Einzelfall durchgeführten Bestimmung im Vergleich zu den bei normalen Patientenproben (d.h. nicht infizierten Patientenproben) erzielten Standardwerte.

20

Im Gegensatz hierzu bedeutet die zusätzliche Heranziehung der Parameter, die durch Peroxidase-Einfärbung sowie Bestimmung der Volumenverteilung der neutrophilen Granulozyten sowie der Standardabweichung der Volumenverteilung aller Leukozyten erzielt wird, sowie die Bestimmung des unspezifischen Anteils aus dem Streulichtdiagramm nach spezifischer Lyse aller Zellen, dass, je höher die Werte sind, desto höher die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Plasmodieninfektion ist.

30

Des Weiteren werden Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren detailliert beschreiben.

Es zeigen:

Figur 1 eine schematische Darstellung einer durchfluszytometrischen Vorrichtung 1 zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Figur 2 eine schematische Darstellung des Groß-Winkel-Streulichts anhand einer roten Blutzelle 11, das mit der Granularität und Dichte der Zelle korreliert und in einem typischen Bereich von 5° bis 15° gemessen wird. Dies entspricht der Bestimmung der Zelldichte.

Figur 3 die Bestimmung des Zellvolumens (bzw. der Zellgröße) der Zelle 11 im Klein-Winkel-Streulichtbereich (2° bis 3°).

Figur 4 Streulichtdiagramme, durchgeführt mit dem Gerät ADVIA 2120i, das die beispielhafte Verschiebung des Volumens 16 und der Dichte 17 für Thrombozyten und polymorphkernige Leukozyten (PMNx) bei Malaria-infizierten Blutproben zeigt.

Figur 5 die Ergebnisse einer Analyse nach Peroxidase-Einfärbung mit dem Gerät ADVIA 2120i, das beispielhaft die Volumen- und Dichteverteilung (PEROX Y 26 bzw. PEROX X 27) zwischen einer Malaria-infizierten Probe 24 und einer normalen Probe 25 darstellt. "PEROX Y" 26 bezeichnet die Breite der Peroxidase-negativen Populationen entlang der Y-Achse. Diese erscheint bei einer Malariaprobe länger im Vergleich zu einer normalen Probe. Die Ergebnisse für die Malariaprobe 24 wirken diffuser als die normale Probe 25, was auf die größere Volumenverteilung 26 und Dichtevertteilung 27 zurückzuführen ist.

Im Folgenden wird beispielhaft die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens dargestellt, sowie zwei Algorithmen, die auf Grundlage des erfindungsgemäßen Verfahrens die Bewertung der ermittelten Parameter und eine Vorhersage einer Plasmodieninfektion mit hoher Spezifität und Sensitivität er-

möglichen. Die Messungen wurden mit dem ADVIA 2120i-System der SIEMENS AG durchgeführt.

Die folgenden Abkürzungen werden verwendet:

5

Parameter	Beschreibung
PMNx	DichteVerteilung der polymorphkernigen Leukozyten
MPC	Verteilung der Zelldichte der Thrombozyten
PLT	Gesamtmenge der Thrombozyten in der Blutprobe
PLT mode	Geräteeinstellung von ADVIA 2120i
%Baso Noise	Unspezifischer Anteil aus dem Streulichtdiagramm (Klein- und Großwinkelstreuung) nach spezifischer Lyse durch BASO Lysereagenz
%Abnorm	Standardabweichung der ClusterVerteilung alle Leukozyten
PEROX Y Sigma	VolumenVerteilung der neutrophilen Granulozyten nach Peroxidase-Einfärbung

Gemäß einer ersten erfindungsgemäßen Auswertung ergab sich folgender Algorithmus 1 für ein Nachweisverfahren für eine
10 Malariainfektion mit hoher Spezifität:

$$\text{PLT} \times \text{MPC} / 100 < 47 \text{ und} \\ \text{PMNx} + 0,1635 \times (\text{PLT} \times \text{MPC} / 100) < 33$$

15 Anhand dieses Algorithmus zeigt sich deutlich (siehe unten), dass das zueinander ins Verhältnis setzen der Ergebnisse einer Differentialanalyse der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten bezüglich der Verteilung der Zelldichte (PMNx) mit der Thrombozytenanzahl und der Verteilung der Zelldichte der Thrombozyten in der Probe gegebenenfalls unter Hinzuzie-
20

hung weiterer Unteralgorithmen (1b und 1c) zu einer sehr hohen Spezifität führt.

Unter Hinzuziehung der weiteren Unteralgorithmen

5

PLT mode - 30 x %Baso Noise < 27 sowie
Perox Y Sigma + 12/70 x %Abnorm > 12

ergab sich eine Testspezifität für Malaria von 99 % sowie ei-
10 ne Sensitivität von 76,5 %.

Algorithmus 1 kann insofern in vorteilhafter in Ländern mit einer hohen Prävalenz von Malaria verwendet werden.

15 Für Länder mit einer niedrigen Malaria Prävalenz würde sich der folgende Algorithmus 2 anbieten:

- 2a. PMN peak + 14 / 140 x (PLT x MPC)/100 < 34
- 2b. Baso Noise > 0,074
- 20 2c. PLT Mode + 25 x %Baso Noise < 45
- 2d. Perox Y Sigma > 6,6

Die beobachtete Spezifität betrug 90,2 %, die Sensitivität 98,9 %. Mit anderen Worten kann durch den Algorithmus 2 eine
25 extrem hohe Sensitivität erreicht werden.

Damit können durch den Algorithmus 1 in einer großen Probenpopulation beinahe alle Malaria positiven Proben erkannt werden, wohingegen sich Algorithmus 2 insbesondere für Screening-Untersuchungen eignet. Auch eine Kombination beider Algo-
30 rithmen kann zusätzliche Vorteile mit sich bringen.

Bezugszeichenliste

- 1 Vorrichtung zur Durchfluszytometrie
2 Laser
5 3 Sensormodul
4 Optische Linsen
5 halbdurchlässiger Spiegel
6 Blende
7 Spiegel
10 8 Sensor
9 Sensor
10 Sensor
11 Zelle
12 Baso Volumen
15 13 Baso Konfiguration
14 Großwinkel PLT Scatter
15 Kleinwinkel PLT Scatter
16 Thrombozyten Volumen
17 Thrombozyten Komponenten
20 18 Unspezifischer Anteil aus dem Streulichtdiagramm
19 Lymphozyten
20 Große ungefärbte Zellen
21 Monozyten
22 Neutrophile Leukozyten
25 23 Eosinophile Leukozyten
24 Malariaprobe
25 Normale Probe
26 Peroxy-Sigma
27 Absorption

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Plasmodieninfektion in einer Patientenblutprobe, umfassend die Schritte:

- 5 a) Durchführen einer Differentialanalyse der polymorphen kernigen neutrophilen Granulozyten in der Probe und Bestimmen der Verteilung des Zellvolumens und der Zelldichte;
- 10 b) Bestimmen der Thrombozytenanzahl in der Probe;
- 15 c) Bestimmen der Verteilung der Zelldichte der Thrombozyten in der Probe;
- 20 d) Gewinnen von Probenparametern aus den in a) – c) durchgeführten Bestimmungen; und
- 25 e) Bewerten der Parameter gegenüber einem vorherbestimmten Kriterium, wobei bei Erfüllung des Kriteriums eine Plasmodieninfektion vorliegt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Bestimmung der Parameter durch Streulichtmessung erfolgt.

20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei es sich bei der Plasmodieninfektion um eine Infektion mit *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* oder *Plasmodium knowlesi* handelt.

25 4. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei zusätzlich eine Sphärisierung und Differentialanalyse der Retikulozyten und Erythrozyten durch Streulichtmessung und Absorptionsmessung erfolgt.

30 5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei zusätzlich nach einer -Einfärbung aller Leukozyten in der Probe eine Differentialanalyse durch Streulichtmessung und Absorption erfolgt.

35 6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Einfärbung mittels 3-Chlor-1-naphthol als Substrat durchgeführt wird.

7. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei zusätzlich nach einer -Einfärbung die Bestimmung der Volumenverteilung der neutrophilen Granulozyten erfolgt.

5

8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei zusätzlich als Parameter die Standardabweichung der Volumenverteilung und Absorptionsverteilung aller Leukozyten nach Einfärbung verwendet wird.

10

9. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bestimmung in a) nach Lysieren wenigstens der eosinophilen und neutrophilen, nicht jedoch der basophilen Leukozyten, durch ein geeignetes Lysereagenz erfolgt.

15

10. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei nach einer spezifischen Lyse aller Zellen außer der basophilen Leukozyten der unspezifische Anteil aus dem Streulichtdiagramm (Klein- und Großwinkelstreuung) bestimmt wird.

20

11. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei niedrige Werte der in a), b) und c) bestimmten Parameter prädiktiv für das Vorliegen einer Plasmodieninfektion sind.

25

30

12. Verfahren nach Anspruch 7,8 und 10, wobei eine Erhöhung der Parameter prädiktiv für das Vorliegen einer Plasmodieninfektion ist.

13. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, das mit einem automatisierten Zellzählgerät durchgeführt wird.

1/4

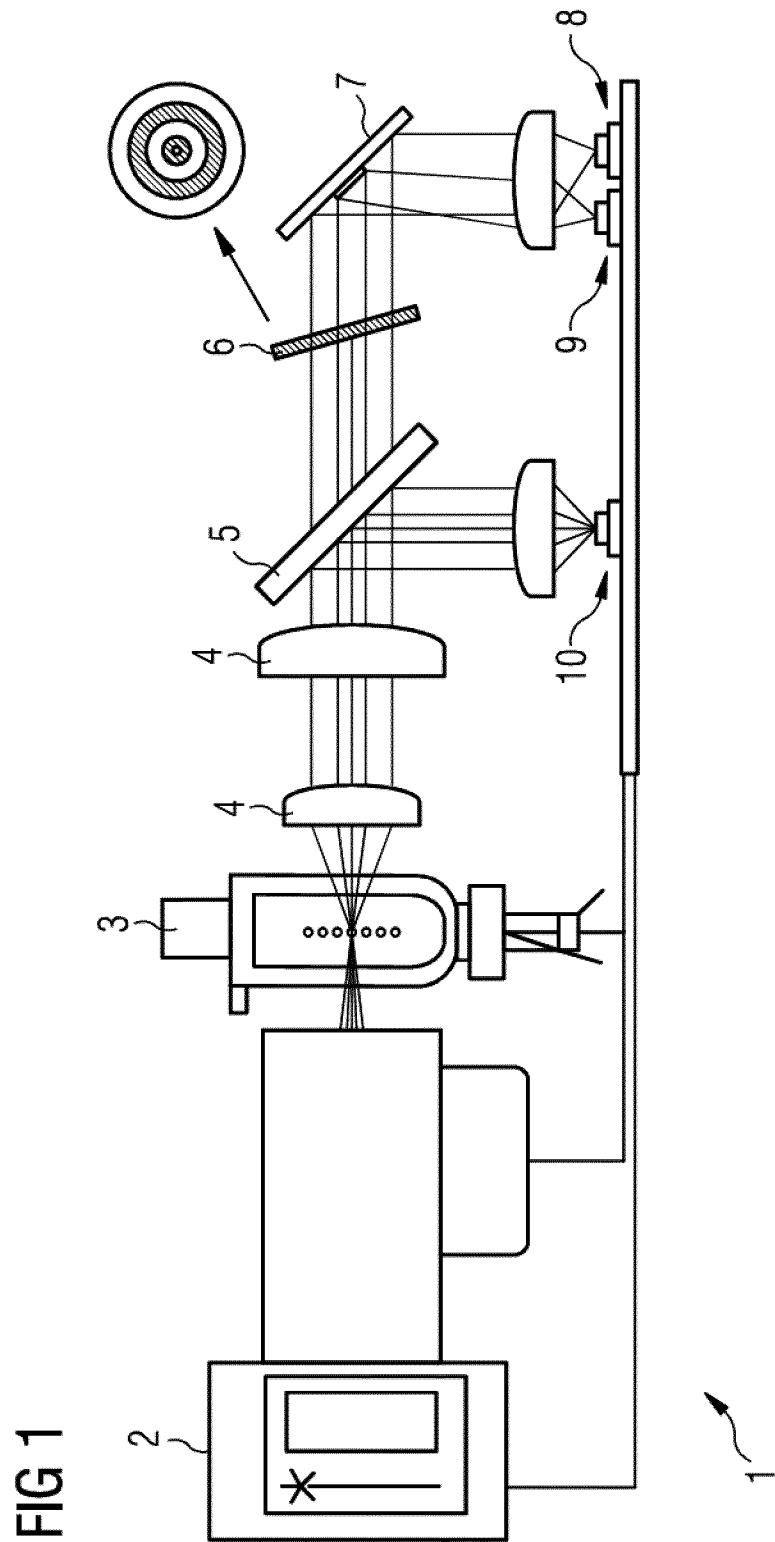


FIG 1

2/4

FIG 2

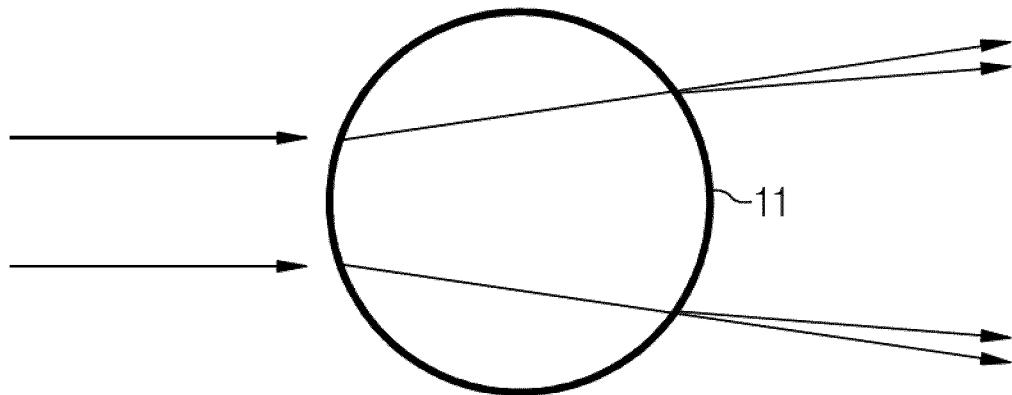
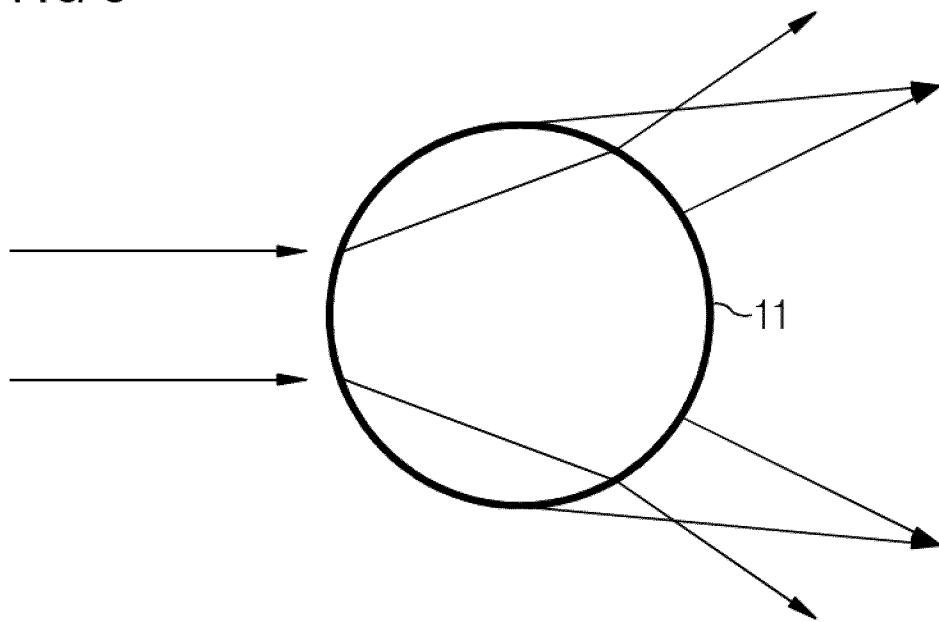
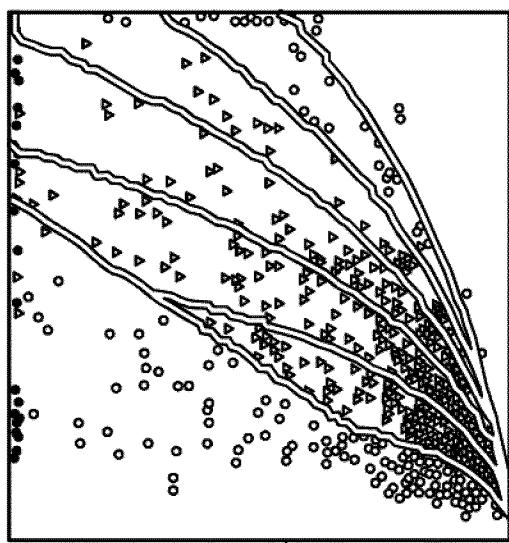


FIG 3



3/4

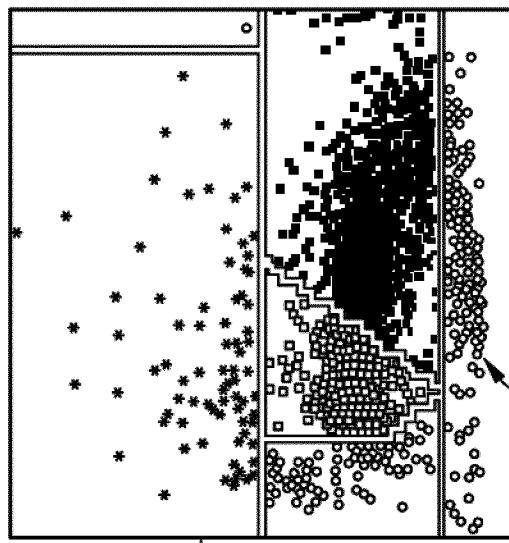


14



15

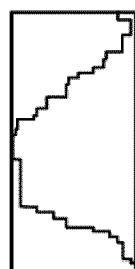
17



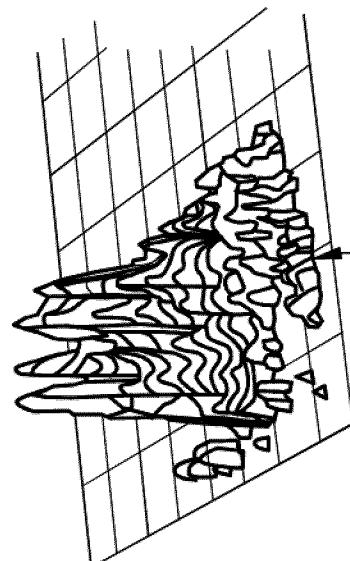
16



17



18



18

FIG 4

4/4

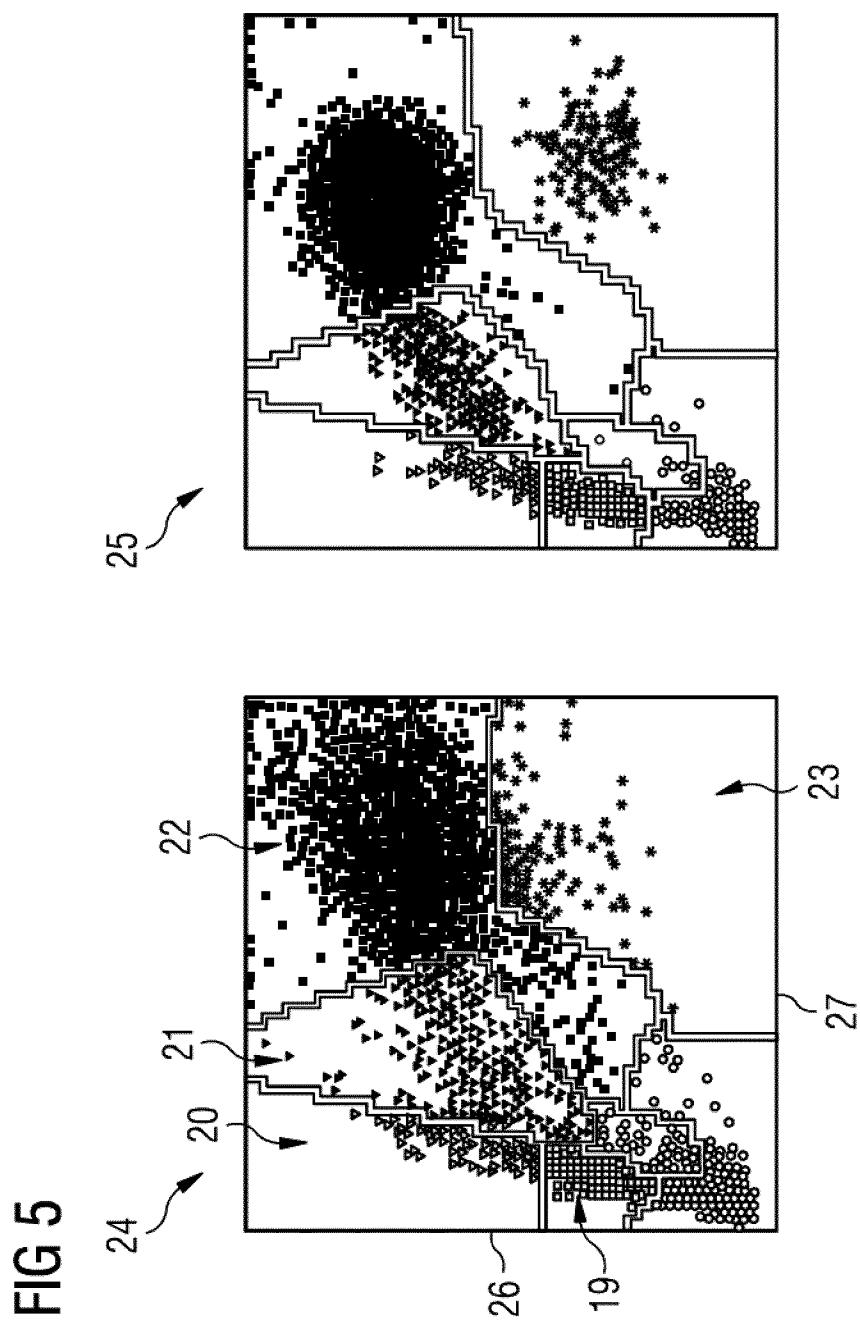


FIG 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/073428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12Q1/02 G01N15/14
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPENDEX, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/088301 A1 (BECKMAN COULTER INC [US]) 22 September 2005 (2005-09-22) cited in the application claims 1,4-9; tables 3,4 ----- A EP 0 545 313 A1 (MILES INC [US]; SINAI SCHOOL MEDICINE [US] BAYER AG [US]; SINAI SCHOOL) 9 June 1993 (1993-06-09) claims 8,9 ----- -/-	1-13 4

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 March 2012	15/03/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer van der Kooij, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/073428

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM ET AL: "Subtyping lymphocytes in peripheral blood by immunoperoxidase labeling and light scatter/absorption flow cytometry.", CLINICAL CHEMISTRY, vol. 31, no. 9, 1 September 1985 (1985-09-01), pages 1481-1486, XP55021365, ISSN: 0009-9147 abstract -----	5,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/073428

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2005088301	A1 22-09-2005	EP 1718966	A1	08-11-2006
		JP 4644244	B2	02-03-2011
		JP 2007525674	A	06-09-2007
		US 2005221396	A1	06-10-2005
		WO 2005088301	A1	22-09-2005
<hr/>				
EP 0545313	A1 09-06-1993	AT 155887	T	15-08-1997
		AU 661728	B2	03-08-1995
		CA 2077790	A1	06-06-1993
		DE 69221086	D1	04-09-1997
		DE 69221086	T2	13-11-1997
		DK 0545313	T3	16-02-1998
		EP 0545313	A1	09-06-1993
		ES 2104802	T3	16-10-1997
		IL 103056	A	15-04-1997
		JP 2711786	B2	10-02-1998
		JP 6180316	A	28-06-1994
		US 5284771	A	08-02-1994
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/073428

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. C12Q1/02 G01N15/14
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N C12Q

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPENDEX, FSTA

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 2005/088301 A1 (BECKMAN COULTER INC [US]) 22. September 2005 (2005-09-22) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1,4-9; Tabellen 3,4 ----- A EP 0 545 313 A1 (MILES INC [US]; SINAI SCHOOL MEDICINE [US] BAYER AG [US]; SINAI SCHOOL) 9. Juni 1993 (1993-06-09) Ansprüche 8,9 ----- -/-	1-13
		4



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

9. März 2012

15/03/2012

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van der Kooij, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/073428

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A 2	KIM ET AL: "Subtyping lymphocytes in peripheral blood by immunoperoxidase labeling and light scatter/absorption flow cytometry.", CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 31, Nr. 9, 1. September 1985 (1985-09-01), Seiten 1481-1486, XP55021365, ISSN: 0009-9147 Zusammenfassung -----	5,6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/073428

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2005088301	A1 22-09-2005	EP 1718966 A1 JP 4644244 B2 JP 2007525674 A US 2005221396 A1 WO 2005088301 A1	08-11-2006 02-03-2011 06-09-2007 06-10-2005 22-09-2005
EP 0545313	A1 09-06-1993	AT 155887 T AU 661728 B2 CA 2077790 A1 DE 69221086 D1 DE 69221086 T2 DK 0545313 T3 EP 0545313 A1 ES 2104802 T3 IL 103056 A JP 2711786 B2 JP 6180316 A US 5284771 A	15-08-1997 03-08-1995 06-06-1993 04-09-1997 13-11-1997 16-02-1998 09-06-1993 16-10-1997 15-04-1997 10-02-1998 28-06-1994 08-02-1994