

P.- 34.459

U.S. Patent 3.256.732



337678

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

P A T E N T E D E I N T R O D U C C I O N

formulada el 7 de Marzo de 1.967, con el núm. 337.678

e n

E S P A Ñ A

por DIEZ años

a nombre de MILES LABORATORIES, INC., entidad norteamericana, establecida en 1127 Myrtle Street, Elkhart, Indiana, Estados Unidos de América, por:

"UN METODO PARA PRODUCIR UN SISTEMA INDICADOR INMUNOLOGICO PARA DETECTAR GONADOTROPINA CORIONICA EN UNA MUESTRA DE ORINA"

Este invento se refiere a un nuevo ensayo de diagnóstico inmunológico para ser utilizado en la determinación de la presencia o ausencia del embarazo, especialmente en hembras humanas. Más particularmente, este ensayo está basado en una preparación inmunológica y en un método que determina específicamente el embarazo mediante ensayos conducidos sobre un fluido corporal o fisiológico, tal como una muestra de orina, obtenido de una mujer sospechosa de estar embarazada.

5

7.4.67.



Hasta ahora, se han utilizado un cierto número de ensayos de embarazo. Existen ensayos biológicos que implican la utilización de un animal específico. Entre dichos ensayos hay uno conocido familiarmente como "el Ensayo del Conejo" (también conocido como el ensayo de Friedman), otro conocido como "el Ensayo del Ratón" (también conocido como el ensayo de Aschheim-Zondek), y un tercer tipo de ensayos conocido como "el Ensayo de la Rana". Estos ensayos no pueden ser realizados por el técnico ordinario de laboratorio, pueden necesitar varios días para su ejecución, requieren el sacrificio del animal, y entrañan un cierto número de operaciones y observaciones intermedias.

Una grave desventaja de los ensayos biológicos consiste en que muchos laboratorios de hospitales o consultas de médicos no tienen dispositivos para conservar los animales. Además, el animal utilizado en el Ensayo del Ratón, del Conejo o de la Rana tiene determinadas exigencias específicas. El ratón debe ser una hembra no madura de una edad específica, los conejos deben ser hembras vírgenes que no han sido enjauladas con machos, y las ranas dan resultados falsos durante ciertas estaciones. Consecuentemente, un ensayo inmunológico del embarazo tiene un número de ventajas específicas. No requiere el suministro de animales especiales, y eliminará los cuidados requeridos para desarrollar un ensayo con exactitud. En su aplicación final, se pretende que el ensayo se desarrolle en una consulta de médico sin la necesidad de un laboratorio. Además, el ensayo se puede desarrollar por una persona no adiestrada, tal como un recepcionista o una enferme

30
7.4.67.



ra de médico.

El presente invento está basado en un método inmunológico para la detección de cantidades significativas de la hormona de gonadotropina coriónica - citado en lo que sigue como CGTH. Esta técnica inmunológica representa una mejora sustancial cuando se la compara con análisis químicos o biológicos ordinarios.

Ensayos químicos, que son satisfactorios para la detección de moléculas relativamente simples, por ejemplo glucosa, cetonas, aldehidos, etc., no pueden distinguir entre moléculas complejas muy complicadas que pertenecen a la misma familia o categoría de compuestos. Por ejemplo, no se pueden diferenciar, mediante ensayos químicos, entre miembros separados de la familia de proteínas, muco-proteínas, lipo-proteínas, polisacáridos y similares. Por lo tanto, la mayor parte de las reacciones químicas, ya sea para la porción de proteínas o la de polisacáridos de la CGTH, no pueden distinguir la orina de las embarazadas de las no embarazadas.

Sin embargo, los ensayos inmunológicos, son específicos para la configuración estérica o espacial de la molécula, y se adaptan a su vez a la porción superficial de la misma. Ya que los anticuerpos presentes en el antisuero se unen de manera homóloga con la CGTH, son capaces de distinguir esta proteína compleja de otras de la misma familia que pueden tener composiciones químicas similares o idénticas. Esta característica de ensayos inmunológicos ha sido verificada ampliamente en el pasado, principalmente en los trabajos de Carl Landstienner y otros. Por lo tanto, utilizando técnicas inmunológicas, es posi-

7.4.67.



ble preparar "identificaciones" específicas para antígenos; dicha condición de especificidad no es posible con ningún ensayo químico simple, que utiliza materiales orgánicos o inorgánicos.

5 La hormona CGTH es producida por el tejido placentario. Este tejido ha sido observado morfológicamente a los 10 u 11 días de la gestación en la hembra humana. Cuando el tejido placentario comienza a formarse como resultado del embarazo, la CGTH producida por la placenta
10 comienza a aparecer en la orina de la mujer. Se ha encontrado que en un espacio de dos a tres semanas después de la fertilización está presente en la mujer una cantidad suficiente de CGTH para ser detectada por la presente técnica inmunológica. Es también interesante hacer observar
15 que esta hormona es producida en concentraciones crecientes hasta aproximadamente 16 a 18 semanas después de la concepción, y después de esto está presente en cantidades decrecientes, aunque todavía permanece por encima de valores normales en la semana número 40 del embarazo.

20 Tal como se indicó anteriormente, el invento se refiere a un ensayo del embarazo que está basado en la detección inmunológica de la hormona específica de gonadotropina coriónica.

25 Tal como se apreciará, la utilización de las reacciones inmunológicas es bien conocida en la técnica. Los anticuerpos o "cuerpos inmunes" desempeñan un papel clave en procedimientos inmunológicos. Por ejemplo, es formado un anticuerpo por un individuo, ya sea animal u hombre, cuando un antígeno logra penetrar en el sistema
30 linfático o vascular de la sangre. Estos anticuerpos se

30
7.4.67.



encuentran en la porción de gamma globulina del suero de la sangre. Ya que estos anticuerpos se forman para acoplarse con la configuración externa o estérica del antígeno análogo, poseen un alto grado de especificidad en lo que respecta a su capacidad para combinarse con el antígeno análogo, y lo harán selectivamente en una mezcla de otros materiales similares (es decir una proteína específica en una mezcla de proteínas). Por lo tanto, es posible detectar la presencia de cantidades muy pequeñas de una sustancia antigénica en presencia de grandes cantidades de otros materiales similares por utilización de un anticuerpo que sea específico para una sustancia antigénica particular.

Dicho de manera breve, el presente invento comprende un ensayo del embarazo, en el cual un fluido corporal, tal como sangre, suero, orina y similares, es puesto en contacto con un sistema indicador para detectar la presencia o ausencia de la hormona de gonadotropina coriónica en dicho fluido corporal. En su aspecto más amplio, el invento considera poner en contacto dicho fluido corporal con un antisuero o anticuerpo para la CGTH y un sistema indicador, utilizando técnicas inmunológicas.

El sistema indicador comprende un material indicador que ha sido tratado con CGTH de manera que, en la presencia del anticuerpo, el material indicador se descolorará, resultará coloreado, se aglomerará, precipitará o dará alguna otra indicación visible de la presencia o ausencia de CGTH en el fluido corporal que está siendo ensayado.

30
7.4.67.

El material indicador antes citado puede ser



un material en partículas tales como glóbulos rojos (o cé-
lulas rojas de la sangre), por ejemplo eritrocitos de ove-
ja, o glóbulos rojos fácilmente obtenibles de otras fuen-
tes animales. Puede comprender también una suspensión de
5 latex, tal como una suspensión en partículas de polibuta-
dieno, poliestireno, butadieno-estireno polimerizado, etc.,
material orgánico finamente dividido, materiales silíceos
triturados, etc.

En el concepto del invento se considera el he-
cho de que el material en partículas puede ser puesto en
10 contacto directamente con CGTH, en cuyo caso la hormona se
adhiera a la superficie de las partículas por fuerzas
electrostáticas, fuerzas de Van Der Waal o similares. Se
considera también, sin embargo, que la CGTH puede estar
15 enlazada con el material en partículas por medio de una
unión química, tal como utilizando materiales conjugado-
res ilustrados con la bis-diazo-bencidina (BDB) y simila-
res. En este caso, la suspensión en latex de los glóbulos
rojos de oveja, por ejemplo, es puesta en contacto prime-
20 ramente con la mezcla de BDB y después es puesta en con-
tacto con CGTH. Otros medios de preparación del material
indicador pueden ser utilizados sin apartarse del alcance
del concepto del invento.

Quando se utiliza un material en partículas
25 tal como eritrocitos de oveja, se prefiere que el mismo
sea tratado antes de la conjugación con el agente de con-
jugación en alguna manera, de forma que mejore su estabi-
lidad. Por ejemplo, los glóbulos rojos pueden ser trata-
dos con formaldehido, ácido tánico u otros materiales con-
servadores conocidos, para hacerlos más resistentes a la

30
7.4.67.



hemólisis. Cuando se utiliza una suspensión en partículas de látex, material orgánico finamente dividido o material silíceo finamente triturado, este tratamiento estabilizador no se requiere, desde luego.

5 Tal como se indicó anteriormente, la detección de la CGTH en el fluido corporal necesita poner en contacto al fluido con un antisuero para la CGTH y el indicador inmunológico descrito. Esto se puede realizar mezclando reactivos líquidos en el tubo de ensayo, tal como por
10 ejemplo, la adición del indicador inmunológico a una mezcla líquida del fluido corporal y el antisuero. Se considera también que el indicador puede ser liofilizado, igual que lo puede ser el antisuero, y ser reconstituido con una solución apropiada inmediatamente antes de llevar a
15 cabo el ensayo. Sin embargo, el concepto del invento abarca cualquier medio físico de poner en contacto el sistema indicador con el fluido corporal a ensayar. Por ejemplo, el sistema indicador puede ser configurado en una tableta o puede ser incorporado dentro de la misma. Puede ser im-
20 pregnado sobre una tira de papel y el fluido corporal a ensayar puede ser simplemente goteado sobre la misma, o la tira de papel puede ser sumergida en el mismo.

 El invento considera también un sistema indicador inmunológico que comprende una CGTH en forma de complejo, que ha reaccionado con el anticuerpo para el CGTH,
25 de manera que se pueden juntar entre sí dos o más complejos. Cuando se pone en contacto con un fluido corporal que contiene CGTH, este conjunto se disocia, debido a la mayor afinidad del anticuerpo para la CGTH libre que para
30 la CGTH que ha formado complejo, a la cual está unido. Es
7.4.67.



ta disociación puede ser discernida por alguna manifestación susceptible de ser interpretada, tal como formación de color, desplazamiento de color, cambio físico o similar. Este sistema puede ser incorporado similarmente en una tableta de ensayo, puede ser depositado sobre un soporte absorbente tal como una tira de papel, o alguna de dichas formas físicas que aumentan la facilidad de utilización.

De acuerdo con el concepto del invento, se preparan anticuerpos de CGTH inyectando CGTH en coadyuvante completo de Freund y/o una solución salina de CGTH, en un huésped tal como un conejo. Después de un período establecido de tiempo, el huésped es desangrado y es separado el suero que contiene los anticuerpos. La presencia de anticuerpos en el suero puede ser establecida por procedimientos inmunológicos convencionales o por utilización en un sistema de ensayo tal como el seguidamente descrito.

Los glóbulos rojos de oveja pueden ser empleados como un sistema indicador y pueden ser preparados formando un complejo entre los glóbulos rojos y CGTH utilizando bis-diazobencidina. Cuando se añade este sistema indicador a un sistema que contiene el anticuerpo específico para el CGTH, los glóbulos rojos se aglomeran de manera perceptible. Sin embargo, si el indicador de glóbulos rojos-bis-diazobencidina-CGTH es añadido a una muestra de ensayo que no contiene anticuerpos de CGTH, no tendrá lugar una aglomeración de la sangre.

Así, la adición de orina de una mujer embarazada, es decir orina que contiene CGTH, a un antisuero de gonadotropina coriónica de conejo (suero que contiene anticuerpos de CGTH) da como resultado una combinación entre

30
7.4.67.

337678



los anticuerpos del antisuero y el CGTH de la orina de embarazada. Cuando el indicador, glóbulos rojos que han formado complejo con CGTH, está presente en la mezcla, no puede combinarse con los anticuerpos en el antisuero de conejo, ya que estos anticuerpos han reaccionado preferentemente con la CGTH libre de la muestra de ensayo. De esta manera, no tiene lugar la aglomeración de la sangre. Por lo tanto, la orina de una mujer embarazada no da como resultado la aglomeración de la sangre mientras que la orina de una mujer no embarazada da como resultado una aglomeración de la sangre definida y perceptible.

Por lo tanto, se ha de hacer observar que este concepto del invento implica las operaciones de poner en contacto una muestra de orina de ensayo con dos reactivos: (1) un material que contiene anticuerpos de CGTH, y (2) un material indicador ilustrado por glóbulos rojos que han sido conjugados con CGTH. Si la muestra de ensayo contiene CGTH, es decir si la orina es de una mujer embarazada, no habrá aglomeración de la sangre, susceptible de ser observada. Si, en cambio, la orina no contiene CGTH, tal como en una mujer que no está embarazada, se obtendrá una reacción observable definida.

Se indica seguidamente en detalle la preparación de un cierto número de reactivos que se utilizan en este invento.

Preparación de solución salina tamponada de veronal (STV).

Una cantidad de 5,75 g de barbitál (veronal) es disuelta en 500 ml de agua destilada caliente. La solución es enfriada y se añaden a la misma 35,0 g de cloruro

30
7.4.67.

337678



de sodio, 3,75 g de barbital de sodio, 5 ml de una solución 1 M de cloruro de magnesio y 1,5 ml de una solución 1 M de cloruro de calcio. Después, esta solución es completada hasta 2 litros con agua destilada y es almacenada a 0°C.

5

Esto es una concentración quintuple de STV. Cuando se utiliza esta solución de STV, se añade una parte de la solución de reserva a 4 partes de agua destilada.

10

Preparación de bis-diazo bencidina (BDB).

A 0,92 g de bencidina se añaden 100 ml de agua destilada y 6 ml de ácido clorhídrico 6 N. Se añaden a esta mezcla cien (100) ml adicionales de agua destilada. Después que se ha disuelto la bencidina, la solución es enfriada hasta 0°C en un baño de hielo y sal. Tan pronto como comienzan a formarse cristales de hielo en la solución, se añaden rápidamente, mientras se agita, 6,5 ml de una solución al 10% de nitrito de sodio. Se continúa la agitación hasta que la solución es negativa para el papel de yoduro de almidón. Durante la agitación, no se deberá permitir nunca que la solución alcance una temperatura por encima de 1°C.

15

20

25

30

Este material es de color amarillo pálido, y cuando se añade un tampón de fosfato (pH 7,4) vira a un color pardo rojizo. La solución de color amarillo pálido es estable a la temperatura ambiente durante 5 a 7 horas; a 4°C es estable durante aproximadamente 7 días; cuando está congelada y es almacenada a -20°C, es estable durante aproximadamente 60 días; y cuando es almacenada por debajo de -35°C, es estable durante aproximadamente 6 meses.

7.4.67.



Preparación del indicador.

Eritrocitos de oveja fueron lavados una vez con solución de STV y dos veces con solución salina. 3 ml de CGTH, completados con solución salina hasta una concen-
5 tración de 1 mg de CGTH por ml, fueron colocados en un tubo de ensayo. A esto se añadieron 0,6 ml de solución salina y 0,05 ml de eritrocitos de oveja compactados y lavados. Esta mezcla fue agitada suavemente para asegurar una suspensión homogénea de las células de oveja.

10 Medio ml de solución de bis-diazobencidina (BDB) y 7 ml de la solución tampón de fosfato fueron mezclados a fondo y se añadió 1 ml de esta mezcla al tubo de ensayo anterior. El tubo de ensayo fue entonces agitado y dejado reposar a la temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron 10 ml de albúmina STV, y el tubo de en-
15 sayo fue centrifugado a 1700 rpm durante 6 a 7 minutos. El material flotante fue decantado y el material sólido del fondo del tubo fue nuevamente lavado con aproximadamente 15 ml de albúmina STV. Después de lavar, el material
20 sólido representado por las células de oveja sensibilizadas fue suspendido en 2,5 ml del diluyente.

(La Albúmina-STV es preparada añadiendo 1 g de albúmina de suero bovino a 1 litro de solución de STV y calentando en un horno a 80°C durante 1 hora. Entonces es dejada enfriar y es almacenada a 0°C).
25

Preparación de anticuerpos de gonadotropina coriónica.

Ejemplo 1.

A un conejo que pesaba 3,4 kg se administraron 6 inyecciones intravenosas de CGTH disuelta en solu-
30
7.4.67.



ción salina. (un total de aproximadamente 1500 unidades de CGTH) en un espacio de tiempo de 12 días. Siete días después de la última inyección, se tomó una muestra de la sangre del conejo. La sangre mostró un valor de concentración de 1/40 a 1/360.

Se administraron al conejo otra serie de tres inyecciones intravenosas de CGTH precipitada en alumbre. Siete días después de la última inyección, se tomó otra muestra de sangre y ésta mostró una concentración de 1/1280.

Otra muestra de sangre fue tomada 21 días después de la última inyección y la concentración de la sangre era de 1/320. Este resultado indica que el nivel de anticuerpos tiende a disminuir rápidamente.

Este conejo había recibido un total de 25 mg de CGTH de 2250 U.I.

Ejemplo 2

Un conejo que pesaba 3,7 kg fue inyectado subcutáneamente con un total de 10 mg de CGTH disuelto en 5 ml de solución salina a la que se habían añadido 5 ml de una solución de gel de alumbre, siendo administradas las inyecciones con una separación de dos días.

Un mes después de la última inyección y de nuevo dos días más tarde se inyectaron 2 1/2 mg de CGTH precipitada en alumbre por la vena del oído. Una semana después de la última inyección se tomó una muestra de sangre que mostró una concentración de sangre de 1/2560; tres semanas después de la última inyección la concentración de sangre era de 1/640.

Ejemplo 3

30
7.4.67.



Una solución de 10 mg de CGTH por ml de solución salina fue mezclada con proporciones iguales de coadyuvante completo de Freund. 0,1 ml de la mezcla fueron inyectados en cada una de las plantas de las patas de un conejo que pesaba aproximadamente 3,5 kg. Al final de un período de dos semanas, se inyectó intravenosamente una inyección activadora de medio ml de una solución de 5 mg de CGTH por ml de solución salina, y dos días después de la primera inyección activadora se administró una segunda. Muestras de sangre de este huésped son retiradas al final de una semana a partir de la última inyección activadora, y esta sangre tenía una concentración de 1/2560.

Procedimiento de ensayo.

El antisuero es diluido en dos filas de tubos de ensayo. Las diluciones de antisuero oscilaban entre 1/40 y 1/5120. Esto se efectúa preparando una dilución de 1/40 con el diluyente por ejemplo 1 ml de antisuero por 39 ml de diluyente. 1 ml de la dilución citada es colocado en el primer tubo de cada fila; medio ml de esta mezcla es transferido al segundo tubo de cada fila, que contiene medio ml de diluyente, y esto se repite hasta que se obtiene una dilución de 1/5120.

En la primera fila de tubos se añade 0,1 ml de diluyente a cada tubo y en la segunda fila se añaden 0,1 ml de orina de ensayo. Todos los tubos son entonces agitados y se añade a cada tubo una gota de los glóbulos rojos sensibilizados (eritrocitos de oveja conjugados con CGTH). El último tubo que muestra aglomeración de los glóbulos rojos es tomado como el punto final. La orina que contiene CGTH neutraliza los anticuerpos presentes y se observa

30
7.4.67.



aglomeración solo con menores diluciones de antisuero, mientras que en la fila en la que no está presente CGTH se observó aglomeración en una dilución mucho mayor.

Estudios clínicos.

5 Treinta y tres pacientes embarazadas del Obstetrical Out Patient Department de un Hospital de Universidad fueron utilizadas en este estudio.

10 Catorce de estas pacientes fueron ensayadas con un antisuero que fue preparado tal como se indica en el Ejemplo 2 anterior.

Los eritrocitos de oveja utilizados fueron conjugados de la siguiente manera:

15 Una mezcla de 3,0 ml de CGTH (Parke-Davis Lot número Rx 206.108 con un análisis de 2700 U.I. por mg) de una concentración de 1 mg por ml, fue añadida a 0,6 ml de solución salina, 0,05 ml de eritrocitos de oveja lavados y 1,0 ml de solución salina. Esta mezcla fue agitada suavemente para asegurar una suspensión homogénea de las células de oveja.

20 Medio ml de solución de bis-diazobencidina (BDB) y 7 ml de la solución tampón de fosfato fueron mezclados a fondo y se añadió al tubo de ensayo anterior 1 ml de esta mezcla. Entonces el tubo de ensayo fue agitado y dejado reposar a la temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron 10 ml de albúmina-STV y el tubo de ensayo fue centrifugado a 1700 rpm. durante 6 a 7 minutos. El material flotante fue decantado y el material sólido del fondo del tubo fue lavado nuevamente con aproximadamente 15 ml de albúmina de STV. Esta fue completada hasta 2,5 ml y era aproximadamente una suspensión de células al

30
7.4.67.

337678



2%.

El antisuero utilizado aglomeró las células conjugadas hasta una dilución de 1/2560. Un microgramo de CGTH inhibía esta aglomeración hasta una dilución de 1/320. Diez microgramos de CGTH reducían la concentración hasta 0.

0,1 ml de orina de 6 de las 14 pacientes reducían la concentración hasta por debajo de 1/320. Esto indicaba que 0,1 ml de su orina contenían más de 1 microgramo de CGTH. 0,1 ml de la orina de 7 de las 14 pacientes reducían la concentración hasta 1/320, indicando que estas siete pacientes tenían el equivalente de 1,0 microgramo de CGTH en 0,1 ml de su muestra de orina. Una paciente redujo la concentración hasta 1/640. Esto indicaba que esta paciente tenía menos de 1 microgramo de CGTH en 0,1 ml de la muestra de orina.

Todas las 6 pacientes cuyas muestras de orina contenían más de 1 microgramo de CGTH dieron también resultados positivos en el Ensayo de la Rana. Dos de las 7 pacientes que tenían el equivalente de 1 microgramo de CGTH en su orina dieron un ensayo positivo de la Rana. Las otras 5 pacientes tenían todas ellas ensayos negativos de la Rana, igual que la paciente que tenía menos de 1 microgramo de CGTH en su muestra de orina.

Subsiguientemente, se ensayaron 19 pacientes adicionales. Se utilizaron la misma preparación de antisuero y la misma preparación de CGTH.

En este experimento, la orina fue ajustada a un pH de 7,0 a 7,6 antes del ensayo. La concentración del antisuero era de 1/2560. 0,1 microgramo de CGTH no tenía



efecto. Un microgramo de CGTH reducía la concentración (inhibía la aglomeración de las células conjugadas por el antisuero) hasta a una dilución de 1/320. 10 microgramos de CGTH reducían la concentración hasta 0.

5 Entre estas 19 pacientes, 4 indicaron que 0,1 ml de su orina contenía más de 1 microgramo de CGTH. 2 de estas pacientes dieron ensayos positivos de la Rana y las otras 2 dieron ensayos negativos. 6 de las pacientes tenían el equivalente de 1 microgramo de CGTH por 0,1 ml de
10 orina, 5 de estas pacientes dieron ensayos positivos de la Rana y 1 dió un resultado negativo.

9 de las pacientes mostraron menos de 1 microgramo de CGTH por 0,1 ml de orina. 4 de estas pacientes dieron ensayos positivos de la Rana, 2 dieron ensayos negativos, y 3 ensayos dudosos de la rana, citados como negativos.
15

Combinando los datos de las 33 pacientes se tiene la siguiente tabla:

20 TABLA I

20

	Número de pacientes	Ensayo de la rana	
		Positivo	Negativo
Más de 1 microgramo de CGTH/0,1 ml de orina	10	8	2
25 El equivalente de 1 microgramo de CGTH/0,1 ml de orina	13	7	6
Menos de 1 microgramo de CGTH/0,1 ml de orina	10	4	6

30
7.4.67.

Un examen de los datos indicados en la Tabla

337678



anterior indica la correlación de la cantidad de CGTH en la orina y los resultados del Ensayo de la Rana. Se puede observar que en la serie presentada, se obtuvieron un cierto número de respuestas erróneas del Ensayo de la Rana. Es particularmente evidente que cuando están presentes en la orina cantidades de CGTH de 1 microgramo por 0,1 ml o menos, los resultados del Ensayo de la Rana son irregulares.

Una segunda realización del presente invento comprende un material indicador mejorado que es estable durante largos períodos de tiempo y que puede ser liofilizado y conservado durante 6 meses a 2 años. Este indicador mejorado puede ser formado tratando con formalina el material en partículas utilizado en la preparación del indicador. Por ejemplo, eritrocitos de oveja son tratados con formaldehído, son hechos reaccionar con bis-diazobencidina (BDB) y después son conjugados con CGTH.

Esta realización será explicada más particularmente haciendo referencia a lo siguiente:

Preparación de glóbulos rojos de oveja tratados con formalina.

Seis porciones de 2 ml de formaldehído de calidad U.S. P. al 37% fueron ajustadas a un pH de 7,3 con NaOH 1 N, y el volumen total fue completado hasta 25 ml añadiendo solución salina al 0,85%.

1 ml de eritrocitos de oveja compactados fue lavado tres veces por centrifugación a partir de 10 volúmenes en solución salina isotónica. Las células lavadas fueron suspendidas entonces en 11,5 ml de solución salina isotónica y 12,5 ml de la solución de formaldehído añadi-

30
7.4.67.



do. La mezcla fue mantenida a 37°C durante 18 a 20 horas y después fue lavada cuatro veces por centrifugación a partir de 10 volúmenes de agua destilada por lavado.

Preparación del indicador.

5 Una porción de 0,5 ml de células tratadas con formalina compactadas, fue mezclada a fondo con 10 ml de solución salina que contenía 10 mg de CGTH. Esta mezcla de células y CGTH fue mezclada después a fondo con una solución recientemente preparada de 1,5 ml de BDB en 6 ml
10 de tampón de fosfato (0,11 M, pH 7,4). La mezcla fue incubada después con agitación constante durante 20 minutos a la temperatura ambiente, para conjugarse las células a la CGTH con BDB. El conjugado fue lavado después dos veces por centrifugación a partir de 100 ml de albúmina -STV.
15 Se preparó para ser utilizada una suspensión al 1% del conjugado en albúmina -STV. Esta suspensión puede ser liofilizada hasta un polvo pardo claro que es fácilmente suspendida de nuevo para ser utilizada.

Procedimiento de ensayo

20 El antisuero es diluido en dos filas de tubos de ensayo. Las diluciones del antisuero oscilan entre 1/200 y 1/51.200. Esto se efectúa preparando una dilución de 1/200 con el diluyente, por ejemplo 0,1 ml del antisuero por 19,9 ml del diluyente. 1 ml de la dilución indicada es colocado en el primer tubo de cada fila; medio ml
25 de esta mezcla es transferido al segundo tubo de cada fila que contiene medio ml de diluyente, y esto se repite hasta que se obtiene una dilución de 1/51.200.

30 En la primera fila de tubos se añade una gota de diluyente a cada tubo y en la segunda fila se añade una
7.4.67.



gota de orina de ensayo. Todos los tubos son agitados entonces y se añade a cada tubo una gota de las células sensibilizadas (eritrocitos de oveja conjugados con CGTH). El último tubo que muestra aglomeración de glóbulos rojos es tomado como el punto final. La orina que contiene CGTH neutraliza los anticuerpos presentes y se observa aglomeración solo con menores diluciones de antisuero, mientras que en la fila en la que no estaba presente CGTH, se observó aglomeración a una dilución mucho mayor que la que se muestra en la Tabla II.

TABLA II

Detección de CGTH utilizando células de oveja tratadas con formalina, conjugadas con CGTH.

Dilución de antisuero	Adiciones		
	Una gota de diluyente	Una gota de orina de ensayo	
		No embarazada	Embarazada
1-200	+	+	+
1-400	+	+	+
1-800	+	+	+
1-1.600	+	+	-
1-3.200	+	+	-
1-6.400	+	+	-
1-12.800	+	+	-
1-25.600	+	-	-
1-51.200	-	-	-

+ indica aglomeración; - indica ninguna aglomeración.

30
7.4.67.



Para ilustrar la estabilidad del indicador que se prepara con el conjugado de glóbulos rojos con formalina-BDB-CGTH antes descrito, se dan los siguientes datos.

5 Los glóbulos rojos de oveja fueron divididos en dos porciones iguales. Una porción fue sometida a la operación de tratamiento con formalina que se describe anteriormente y la segunda porción no fue tratada. Ambas porciones fueron conjugadas entonces con BDB y CGTH, para
10 preparar indicadores para el ensayo anteriormente descrito.

 Después de la preparación y de ensayar con relación a un antisuero común, ambos indicadores dieron una concentración de 1/1280. Al final de una semana, el indicador que utilizaba las células no tratadas hubo de ser
15 desechado debido a la lisis de las células, mientras que un mes más tarde el indicador preparado con las células tratadas daba todavía una concentración de 1/1280 con el antisuero común. Este indicador fue entonces liofilizado.

20 Al final de cuatro, y siete meses, el indicador liofilizado fue reconstituido con agua destilada hasta 6,6 mg /ml, o suspensión al 1%, y dio concentraciones satisfactorias al final de estos períodos.

 La reconstitución seguida por incubación a
25 37°C durante la noche no afecta a la estabilidad del indicador preparado a partir de células tratadas con formalina, ni lo hace una refrigeración durante un período de tiempo tan largo como un mes.

 El presente invento tiene también como objetivo la adaptación del indicador estable que se describe
30 anteriormente.
7.4.67.



18

5 teriormente a una composición de diagnóstico para detectar la presencia de CGTH en solución en un simple ensayo de un único tubo. En esta composición, la presencia o ausencia de CGTH es detectada por medio de un indicador inmunológico que consiste en eritrocitos de oveja tratados con formalina u otros glóbulos rojos que han sido conjugados con CGTH utilizando BDB y el conjugado que subsiguientemente ha formado complejo con el anticuerpo para CGTH. Este nuevo y mejorado indicador inmunológico puede ser de

10 nominado aglomerado inmune que consiste en glóbulos rojos conjugados con CGTH y anticuerpo para formar un complejo aglomerado. Cuando este indicador es expuesto a CGTH soluble, tal como por ejemplo la orina de una mujer embarazada, el complejo aglomerado tiende a resultar disociado a

15 causa de que la porción de anticuerpo del complejo reacciona preferentemente con el CGTH en solución. Así, cuando el nuevo indicador de este invento es combinado con la orina de una mujer embarazada, es decir CGTH en solución, tendrá lugar una disociación, y el indicador de glóbulos

20 rojos-BDB-CGTH se sedimentará en el fondo del recipiente de ensayo en una forma no aglomerada. Si no está presente CGTH en solución, tal como en la orina de una mujer no embarazada, el indicador inmunológico permanecerá aglomerado.

25 Este concepto será descrito seguidamente con más claridad:

Ensayo de un único tubo.

30 Suero de conejo, que contenía anticuerpos de CGTH, fue calentado durante 30 minutos a 56°C y después fue tratado con un volumen igual de eritrocitos de oveja.

7.4.67.

337678



(Esto es para eliminar anticuerpos heterófilos). Este suero de conejo tratado (antisuero) fue diluido de 1 a 8 con albúmina - STV, y se combinó medio ml del antisuero diluido con 5 ml de suspensión al 1,25% del conjugado de glóbulos rojos tratados con formalina-CGTH-BDB. La mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 20 minutos, fue lavada dos veces por centrifugación a partir de 25 ml de albúmina-STV y fue suspendida de nuevo en 4 ml de albúmina-STV. Esta suspensión al 1,5% fue dividida en porciones de una gota y fue colocada en tubos de vidrio de 10 x 75 mm, y se añadieron a cada tubo 0,1 ml de STV no diluido que contenía 750 mg % de albúmina y 2% de sacarosa. Entonces los tubos fueron liofilizados.

El ensayo simple de un único tubo se realiza añadiendo una gota de la orina a ensayar al tubo liofilizado, seguido por 9 gotas de agua destilada. Al final de 2 a 4 horas será fácilmente discernible un botón del conjugado de glóbulos rojos-BDB-CGTH en el fondo del tubo de ensayo, en el caso de la orina de embarazada. Las células aparecerán aglomeradas en el caso de una orina de no embarazada, tal como se muestra en la tabla III.

TABLA III

Ensayo de un único tubo de embarazo

25

Testigo (10 gotas de H ₂ O)	Ensayo (una gota de orina, 9 gotas de H ₂ O)	
	No embarazada	Embarazada
+	+	-

30
7.4.67.

+ indica aglomeración; - indica ninguna aglomeración.

337678



Tubos liofilizados fueron almacenados durante 3 meses a la temperatura ambiente y cuando fueron reconstituidos dieron resultados igualmente buenos con ensayos recientemente preparados.

5 Para resumir brevemente, el presente invento comprende el ensayo de diagnóstico del embarazo que está basado en una reacción inmunológica entre CGTH y su anticuerpo. El ensayo comprende un sistema indicador inmunológico que depende de una combinación de un material en partículas y CGTH, y el anticuerpo para esta hormona. El ensayo está diseñado de tal manera que cuando el sistema indicador inmunológico es puesto en contacto con el fluido corporal que contiene CGTH, ocurre un cambio físico observable, que está evidenciado por un cambio de tamaño de partículas, un cambio de color o algún otro fenómeno observable.

10

15

N O T A

Los puntos de invención propia, no nueva, pero no establecida, practicada ni divulgada en España, que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Introducción, por DIEZ años, son los siguientes:

20

1.- Un método para producir un sistema indicador inmunológico para detectar gonadotropina coriónica en una muestra de orina, que comprende preparar una suspensión de gonadotropina coriónica, un material en partículas

24
6.2.68.

337678

16 FEB



5 seleccionado del grupo consistente en glóbulos rojos y glóbulos rojos tratados con formalina y bis-diazobencidina, agitar la suspensión, y separar el material indicador formado y añadirle el anticuerpo para la gonadotropina coriónica.

2.- El método de la reivindicación 1, en que el material en partículas es de glóbulos rojos tratados con formalina y la mezcla formada es liofilizada después hasta la forma de polvo.

10 3.- Un método para producir un sistema indicador inmunológico para detectar gonadotropina coriónica en una muestra de orina, que comprende preparar una suspensión de gonadotropina coriónica y un material en partículas seleccionado del grupo que consiste en glóbulos rojos y glóbulos rojos tratados con formalina en una solución salina, añadir a ésto, con agitación, bis-diazobencidina y recuperar el material indicador formado.

15 4.- El método de la reivindicación 3, en que el material en partículas es de glóbulos rojos tratados con formalina y el indicador recuperado es liofilizado hasta la forma de polvo.

20 5.- Un método para producir un sistema indicador inmunológico para detectar gonadotropina coriónica en una muestra de orina.

25 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

6.2.68.

337678



Esta Memoria consta de veinticinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

16 FEB. 1968

Madrid,

P. A.

Alberto de Elzabero
Por Poder

337678

G. D. S.
6.2.68.