

28 JUN 1967



341 495

## Memoria descriptiva

para solicitar PATENTE DE INVENCION

por VEINTE años

a nombre de MILES LABORATORIES, INC.

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana,

con domicilio en 1127 Myrtle Street, Elkhart, Indiana, Estados Unidos de América

por: " UN METODO DE PREPARAR UN INDICADOR INMUNOLOGICO PARA SER UNIDO QUIMICAMENTE A SUSTANCIAS ANTIGENICAS " (Clase Internacional B01 1)



Este invento se refiere a un indicador inmunológico compuesto por células microbianas, que tiene un agente de copulación unido con las mismas que puede ser ligado químicamente con sustancias antigénicas con el fin de crear sistemas indicadores inmunológicos, que se pueden utilizar para detectar visualmente antígenos o anticuerpos homólogos, y se refiere también a métodos para preparar dicho indicador inmunológico y a sistemas de ensayo y a dispositivos basados en dichos sistemas indicadores.

10           La capacidad de detectar la presencia de sustancias antigénicas en diversos fluidos tiene una extensa importancia. En muchos procedimientos industriales, los materiales proteínicos que tienen características antigénicas son utilizados como reaccionantes o son hechos actuar de alguna  
15           otra manera. La aptitud para detectar cambios en la concentración de estos materiales, con el fin de observar o seguir dichas reacciones, es de importancia primordial para el control de estos procedimientos industriales y para la aptitud de los mismos para ser reproducidos. Otro campo de gran importancia es el de la detección de diversos antígenos y anticuerpos en fluidos corporales. Los niveles o concentraciones de muchas de las hormonas, proteínas, lipoproteínas, mucoproteínas, glicoproteínas, etc., y sus productos de hidrólisis que aparecen de forma natural en el cuerpo así como  
20           durante diversos estados patológicos, son de gran importancia para los profesionales de la medicina. Algunas de estas sustancias interesantes han sido tradicionalmente difíciles de detectar utilizando los métodos químicos analíticos normales. Sin embargo, empleando procedimientos de análisis o  
25           ensayo inmuoquímicos, algunos de estos antígenos y anticuer-

30



pos son susceptibles de ser detectados en mezclas que contienen otras moléculas grandes que tienen agrupaciones químicas similares, pero que no tienen exactamente la misma configuración espacial de la macromolécula que interesa. Un  
5 cierto número de estos procedimientos inmunológicos han sido difíciles de realizar y frecuentemente han sido prolijos y técnicamente complicados, pero se ha confiado en ellos para detectar la presencia de dichas sustancias en diversos fluidos corporales. Para algunos antígenos y anticuerpos no se  
10 ha dispuesto de ningún procedimiento de ensayo.

Más recientemente, se han perfeccionado sistemas de hemoaglutinación (aglutinación de glóbulos rojos) para detectar antígenos o sus anticuerpos. Estos sistemas emplean glóbulos rojos como partículas indicadoras, las cuales para ser  
15 utilizadas, son unidas de alguna manera con una sustancia antigénica con el fin de proporcionar un sistema indicador que se pueda utilizar para detectar el anticuerpo homólogo o la sustancia antigénica propiamente dicha. Para una determinación de la presencia o ausencia de la sustancia que se  
20 ensaya, por utilización de dichos sistemas, es necesario usualmente interpretar el aspecto del dibujo exhibido por los glóbulos rojos con el fin de determinar si ha tenido lugar hemoaglutinación. La hemoaglutinación tiene lugar cuando el anticuerpo homólogo está presente en el medio de ensayo  
25 en una forma que le permite reaccionar con la sustancia antigénica copulada con los glóbulos rojos y para formar con la misma un complejo inmune. La hemoaglutinación no tiene lugar cuando el anticuerpo homólogo no puede formar complejo con los glóbulos rojos con los que está copulada la sustancia antigénica. Dependiendo de muchas condiciones, inclu-



yendo los tampones y otros materiales muy reactivos, este procedimiento de ensayo es de aplicabilidad limitada, y tiene el antecedente de requerir personal adiestrado para interpretar el aspecto de los dibujos resultantes, aunque

5 se han establecido para algunas sustancias sistemas de ensayo practicable o factibles. Otra dificultad perturbadora asociada con los sistemas de hemoaglutinación es la conocida como "problema de anticuerpos heterófilos", que es originado por algunas de las proteínas del suero contenidas en

10 la solución de antisuero, que reaccionan con los grupos antigénicos presentes de forma natural en la superficie de los glóbulos rojos, incluso cuando el antisuero se ha tomado de una especie diferente de la especie animal que produjo los glóbulos rojos utilizados. La ovoalbúmina fué detectada

15 pronto en el suero de esta manera, de acuerdo con Pressman, D., Cambell, D. H., Pauling, L.: Journal of Immunology 44, páginas 101 - 105 (1.942). Un método similar se empleó para detectar un derivado de proteínas purificadas de tuberculina, Cole, L. R. Farrell, V. R. : Journal of Experimental Medicine 102, página 157 (1.955), y la insulina fué detectada

20 en el suero por Arquilla E. R. y Stavitsky A. B., y esto fué informado en Journal of Clinical Investigación 35, páginas 456 - 466 (1.956). La patente USA número 3.266.732 de Edward R. Arquilla describe un sistema similar para ensayar

25 la hormona de gonadotropina coriónica. Una sustancia antigénica patológica, toxoide de difteria, fué también analizada o ensayada de esta manera, Butler, W. T.; Journal of Immunology 90, páginas 663 - 671 (1.965).

Se cree ahora que la limitada utilización comercial de este tipo de ensayo de hemoaglutinación ha sido debido,

30

28 JUN.



en parte, al estrecho margen de tamaños y a la configuración peculiar de los glóbulos rojos de animales que se utilizan usualmente, y que se podría lograr una mayor utilización de los sistemas de ensayo inmunológicos de aglutinación si se pudieran encontrar partículas indicadoras para reemplazar los glóbulos rojos, que permitiesen una mayor variación de tamaños. Generalmente, la utilización de glóbulos rojos de animales como partículas indicadoras para diversos antígenos, excluye la utilización de mecanismos de aglutinación cromatográfico o del tipo para portaobjetos. Igualmente, los glóbulos rojos son caros para ser utilizados comercialmente, ya que se deben criar y sostener animales de laboratorio y se deben prescribir cuidadosamente las condiciones de recogida, para evitar la hemólisis de las células y activar la uniformidad, sin lo cual el ensayo de hemoaglutinación no se puede llevar a cabo de manera reproducible.

Se ha descubierto que las células microbianas servirán como partículas indicadoras inmunológicas y permitirán superar muchas de las dificultades anteriores. Las células microbianas existen con un amplio margen de tamaños y formas, y los tamaños están dentro de los márgenes que se requieren tanto para los ensayos de aglutinación en tubo de ensayo y en portaobjetos como para ensayos de tipo cromatográfico. De esta manera, se puede emplear una variedad de mecanismos de ensayo cuando se utilizan células microbianas como partículas indicadoras. Las células son cultivadas fácilmente bajo condiciones de laboratorio y se pueden producir comercialmente con bajo coste. Las células microbianas pueden ser seleccionadas de acuerdo con el tamaño necesario con las características superficiales que sean más ventajoso-



5 sas para un mecanismo de ensayo particular, y en cuanto a la facilidad para producirlas. De esta manera, es posible, mediante la utilización de células microbianas, una mayor flexibilidad en la construcción de sistemas de ensayo inmunológico. También, mediante la utilización de células microbianas, se elimina el problema de anticuerpos heterófilos.

10 Tal como se utiliza aquí, el término "partículas indicadoras" se refiere a las células microbianas sin agente de copulación unido a las mismas, "indicador inmunológico" se refiere a las células microbianas con el agente de copulación unido con las mismas, pero sin sustancia antigénica copulada con las mismas, y "sistema indicador inmunológico" se refiere a la combinación de células, agente de copulación y sustancia antigénica.

15 Por lo tanto, un objeto de este invento es el de crear un indicador inmunológico compuesto de células microbianas y un agente de copulación química unido, con el cual las sustancias antigénicas se pueden copular de forma covalente, y que se puede utilizar para indicar visualmente reacciones de antígenos y anticuerpos.

20 Otro objeto del presente invento es el de crear un indicador inmunológico para reacciones de antígenos y anticuerpos, que consiste en uno cualquiera entre un amplio margen de tamaños de células microbianas.

25 Otro objeto consiste en crear un sistema indicador inmunológico para utilizarse en la detección de un anticuerpo en que el sistema indicador está compuesto por células microbianas copuladas químicamente con el antígeno homólogo para dicho anticuerpo por medio de un agente de copulación química.

30



Todavía otro objeto del presente invento es el de crear un sistema indicador inmunológico para utilizarse en la detección de un antígeno, y para utilizarse en unión con el anticuerpo homólogo, en que el sistema indicador está compuesto por células microbianas copuladas químicamente con dicho antígeno por medio de un agente de copulación química.

Todavía otro objeto consiste en crear indicadores inmunológicos del tipo anterior en forma pulverizada y seca soportada sobre un vehículo o soporte de material absorbente, para proporcionar dispositivos de ensayo basados en dichos sistemas.

El indicador inmunológico del presente invento puede ser descrito de forma breve como uno que está compuesto por células microbianas a la que están unidas químicamente moléculas de un agente de copulación que tiene al menos un grupo reactivo no ligado, que es capaz de formar un enlace covalente con un grupo reactivo en sustancias antigénicas por contacto y por reacción con las mismas. El indicador es preparado suspendiendo las células microbianas en un líquido, y añadiendo al mismo el agente de copulación que es capaz de reaccionar con un grupo reactivo sobre la superficie de las células microbianas. La sustancia antigénica que se ha de copular con las células microbianas puede estar presente en la misma suspensión líquida cuando se añade el agente de copulación, de manera que se forma inmediatamente un sistema indicador inmunológico específico, o la sustancia puede ser añadida más tarde al indicador preparado. La copulación del indicador con una sustancia antigénica forma un sistema indicador que se puede utilizar de una manera específica, tal como se describe seguidamente.



Las células microbianas del indicador inmunológico y del sistema de ensayo pueden ser cualquier microorganismo de reproducción espontánea que se propague con o sin dependencia de otros organismos. Se pueden utilizar tanto células bacterianas gram-positivas como células bacterianas gram-negativas, células de hongos y células de protozoos, que se pueden emplear similarmente, igual que células de virus para algunos sistemas de ensayo. Estos son generalmente organismos unicelulares que se reúnen ocasionalmente en aglomerados o pellas. Las células pueden ser utilizadas en esta forma con tal que su tamaño de aglomerado no forme una partícula de soporte que sea tan grande que el sistema de ensayo formado con la misma no se aglutine en presencia de una sustancia que sea homóloga a la sustancia antigénica ligada con las células aglomeradas. Generalmente, las células microbianas preferidas son células bacterianas o aglomerados de las mismas que tienen tamaño y forma uniforme y tienen dimensiones exteriores máximas, en una dirección, de aproximadamente 0,2 a 10 micras. Aunque no se prefiere, se puede utilizar una mezcla de células diferentes pero uniformes. Para estas bacterias, las células microbianas utilizables incluyen las que se encuentran en la División I del Reino Vegetal incluyendo las Clase I, II y III, Orden I. Las células microbianas de la Clase III, Orden I, incluyen los organismos de virus intracelulares, que tienen dimensiones de aproximadamente 0,2 micras.

Se puede hacer referencia al Bergey's Manual of Determinative Bacteriology de R.S. Breed, E.G.D. Murray, H.R. Smith, 7ª Edición, 1947, de Williams and Wilkins Company, para una enumeración completa de las células bacterianas



utilizables. Son particularmente útiles las bacterias de la Clase II, Suborden II, Familia IV (Pseudomonadaceas) y Clase II, Orden IV, Familia IV (Enterobacteriaceas). Se considera que todas las Tribus I-V representan células microbianas preferidas para los fines de este invento. También se consideran preferidas las de la Clase II, Orden IV, Familias V (Brucellaceas), X (Lactobacillaceas) y XIII (Bacillaceas). Se puede emplear organismos de los Ordenes I y II de la Clase III cuando se desean partículas de tamaño menor, aproximadamente de 0,2 micras o inferior. Particularmente los Virus o Virales del orden II son de pequeña dimensión, lo cual limita su utilidad.

Células bacterianas especialmente preferidas son Brucella abortus, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Lactobacillus leichmannii, y Pseudomonas fragi. Las fases de crecimiento de levadura de las células de hongos son también preferidas para ser utilizadas en el invento. Es particularmente preferida la levadura comúnmente disponible, Saccharomyces cerevisiae.

Las células microbianas se pueden utilizar en su estado natural, es decir que el agente de copulación puede ser hecho reaccionar con las mismas y después se puede unir la sustancia antigénica, por medio del agente de copulación. Sin embargo, si se considera que son peligrosas las características patogénicas naturales de una cualquiera de las células microbianas, se pueden eliminar la actividad antigénica natural y por lo tanto las características patogénicas, tratando o matando a las células microbianas con un agente de conservación. Los agentes de conservación más comunes son formaldehído y fenol. Es notable el hecho de que cuando



las células microbianas han sido tratadas con agente de conservación y después han sido alteradas adicionalmente uniendo agentes de copulación y sustancias antigénicas, los grupos antigénicos que aparecen de forma natural sobre las superficies de las células son modificados de forma suficiente para hacerlos inactivos. Con el fin de eliminar de manera completa todas las células que tengan actividad antigénica natural, los sistemas de ensayo preparados pueden ser absorbidos con suero que contiene el anticuerpo para el antígeno naturalmente presente sobre la superficie de las células, con el fin de formar complejos que no interfieran con la experimentación ulterior. Por ejemplo, cuando se utiliza E.Coli para las partículas indicadoras del indicador y están presentes en la muestra de ensayo anticuerpos para E. Coli, se puede bloquear la reacción entre el indicador y su anticuerpo adsorbiendo el indicador de células de E. Coli con antisueros que contienen el anticuerpo para los mismos. Por lo tanto, las células microbianas utilizadas en el presente invento ya no se puede considerar que tienen actividad antigénica natural.

Si se desea, las células microbianas pueden ser coloreadas con el fin de mejorar la capacidad de distinción visual del sistema indicador resultante desde el medio o fondo circundante. Los coloreantes ordinarios, tales como hematoxilina, fucsina y cristal violeta se pueden utilizar para este fin. Otro tratamiento opcional consiste en lavar las células con disolventes orgánicos tales como alcoholes, éteres, etc. para eliminar cualquier capa de polisacáridos o ceras que pueda estar presente.

Los agentes de copulación que pueden ser hechos



reaccionar químicamente con grupos reactivos tanto de las células microbianas como de las sustancias antigénicas son generalmente compuestos que tienen dos o más de los siguientes grupos reactivos: azo, ácido sulfónico, grupos fluoro combinados con grupos nitro, azida, imina, y grupos cloro reactivos conectados con un anillo que tiene apropiadas estructuras de resonancia. Estos grupos reactivos son capaces de reaccionar con los grupos amino primario, sulfhidrilo (mercapto), e hidroxilo en las cadenas polímeras de las sustancias antigénicas y de las superficies de células microbianas.

Una lista representativa de agentes de copulación conocidos es: bis-diazo-bencidina, ácido bis-diazo-bencidino disulfónico, tetraazo-p-fenilenodiamina, difluorodinitro benceno, varias carbodiimidias, diisocianato de tolueno, cloruro cianúrico, dicloro-S-triazina, y perclorato de N-t-butil-5-metil-isoxazolio. Algunos de estos agentes de copulación, especialmente los agentes cianurantes, son capaces de conservar las células al mismo tiempo que se copulan con grupos de las superficies de células microbianas, de manera que no es necesario con estos agentes de copulación ningún tratamiento previo separado para conservar las células. Para utilizar el último compuesto enumerado, las partículas indicadoras son tratadas en primer lugar con un reactivo de succinilación, tal como anhídrido succínico.

Para formar el indicador inmunológico, el agente de copulación es hecho reaccionar en primer lugar con las células microbianas que son suspendidas en un líquido, y después de esto, cuando se necesita, este indicador es mezclado con la sustancia antigénica para formar un sistema indi-

341495



cador. Es decir, el indicador propiamente dicho es considerado como un artículo comercial, ya que puede ser preparado y vendido para ser utilizado por el usuario para construir sistemas de ensayo para cualquier sustancia antigénica particular.

5 La manera preferida de poner en contacto las células microbianas y la sustancia antigénica con el agente de copulación para formar los sistemas de ensayo, consiste en suspender las células microbianas y la sustancia antigénica en un líquido, y añadir al mismo el agente de copulación con mezclado a fondo. Otra manera de poner en contacto consiste en añadir simultáneamente las células microbianas y la sustancia antigénica a una solución que contiene el agente de copulación. Estas maneras de poner en contacto limitan la copulación cruzada o mutua de células microbianas y la copulación cruzada o mutua de moléculas de sustancias antigénicas.

15 Generalmente, cualquier sustancia antigénica puede ser copulada con el indicador inmunológico de este invento. El término "sustancia antigénica", tal como se utiliza aquí, significa un material que, cuando es introducido en el sistema circulatorio de un animal, produce un anticuerpo homólogo. Este amplio margen incluye antígenos de suero tales como gamma-globulina y albúmina de suero o sustancias de grupos de la sangre "A" y "B", para realizar ensayos para determinar el tipo de la sangre. Los antígenos microbianos pueden ser copulados con el indicador para detectar el microbio propiamente dicho o su anticuerpo en fluidos. Substancias de hormona antigénicas presentes en los sistemas de fluidos de organismos pueden ser copulados también con



el indicador. También se pueden utilizar en calidad de sustancias antigénicas enzimas y productos de hidrólisis de proteínas. Los antígenos o anticuerpos microbianos pueden ser de naturaleza bacteriana, fungica, parasitológica o de virus. La exigencia primordial para las sustancias antigénicas consiste en que estas tengan al menos un grupo en sus cadenas polímeras que pueda reaccionar con el grupo reactivo de al menos uno de los agentes de copulación conocidos. Se cree que todas las sustancias antigénicas conocidas cumplen con esta exigencia.

La sustancia antigénica puede ser un material de procedencia natural, o puede ser un material preparado artificialmente. Algunas sustancias de procedencia natural que pueden ser copuladas con el indicador inmunológico de este invento son ovoalbúmina, derivado de proteínas purificadas de tuberculina, insulina, la hormona de gonadotropina coriónica (CGTH), tanto humana como animal, albúmina de suero humano, y gamma-globulina de caballo.

Hay tres métodos generales para realizar ensayos con los sistemas indicadores inmunológicos del presente invento. Estos son los métodos que implican el principio de cromatografía, los que implican la aglutinación en un tubo y los que implican la aglutinación en un portaobjetos. El método particular escogido determina en gran manera el tamaño de las células microbianas que se utilizan.

Para un ensayo de tipo cromatográfico, se prefieren células microbianas que tienen la forma de varillas elipsoidales de aproximadamente 0,3 a 0,4 micras de longitud. Para ensayos de aglutinación en portaobjetos, las células microbianas pueden ser varillas mayores con longitudes de 1 a 3



micras y diámetros de aproximadamente 0,5 micras, con la  
condición de que las células pueden ser igualmente de for-  
ma cocoide. Un ensayo de aglutinación en tubo se puede cons-  
truir a partir de un amplio margen de tamaños de células mi-  
crobianas, incluyendo las dimensiones entre aproximadamente  
5 0,2 micras y aproximadamente 10 micras, en cualquier direc-  
ción de longitud o diámetro.

Los ensayos de aglutinación en tubo y en portaobje-  
tos están basados en la aptitud del sistema indicador inmu-  
nológico para aglutinarse y para formar de esta manera una  
10 diferencia reconocible entre su dibujo y el dibujo exhibido  
en ausencia de aglutinación. Este tipo de experimentación  
se puede realizar de dos maneras generales denominadas en  
el primer caso como aglutinación y en el segundo caso como  
15 inhibición de aglutinación. Para la aglutinación, un anti-  
geno es copulado con la célula microbiana para formar un  
sistema indicador y este se utiliza para ensayar en cuanto  
a la presencia del anticuerpo homólogo en una muestra. Si  
la muestra contiene el anticuerpo, el sistema indicador se  
20 aglutinará con el anticuerpo y este estado puede ser reco-  
nido por el dibujo mostrado o exhibido por el sistema indi-  
cador. Para la inhibición de la aglutinación, el antígeno  
es copulado con la célula microbiana para formar un siste-  
ma indicador inmunológico que es empleado entonces con el  
25 anticuerpo homólogo para ensayar en cuanto a la presencia  
del antígeno en una muestra. Si la muestra contiene el anti-  
geno, será inhibido o neutralizado el anticuerpo homólogo  
por dicho antígeno, y no se aglutinará el sistema indicador.  
En el estado de ausencia de aglutinación, el sistema indica-  
30 dor, consistente en células microbianas insolubles y el an-



tígeno unido, se separará por sedimentación del líquido de ensayo para dar una diferencia reconocible entre su dibujo y el dibujo exhibido por el sistema indicador aglutinado.

La aglutinación, en el caso de un ensayo en porta-  
 5 objetos, está indicada por la formación de un dibujo granu-  
 lado, mientras que en un ensayo en tubo la aglutinación es-  
 tá indicada por una suspensión uniforme y homogénea de célu-  
 las. El estado de ausencia de aglutinación en el caso de un  
 10 ensayo en portaobjetos está indicado por la formación de un  
 dibujo liso, y en el caso de un ensayo en tubo este estado  
 está indicado por la sedimentación del sistema indicador en  
 el fondo del tubo, bien en un dibujo anular o en un dibujo  
 de motas o manchas.

Este mismo tipo de aglutinación o inhibición de  
 15 aglutinación es el fundamento del ensayo de tipo cromato-  
 gráfico, en el cual si la muestra ensayada contiene el anti-  
 geno o anticuerpo particular, habrá una característica par-  
 ticular de desplazamiento o migración presentada por la so-  
 lución cromatográfica. En el caso de un ensayo de aglutina-  
 20 ción del tipo cromatográfico, se deposita una mota o mancha  
 del sistema indicador sobre un soporte cromatográfico apro-  
 piado, tal como papel de filtro, y después se coloca sobre  
 esta misma mancha una gota de la muestra de fluido que se  
 ha de ensayar en cuanto a la presencia del anticuerpo, y el  
 25 borde de este soporte es puesto en contacto con una solución  
 cromatográfica tal como una solución salina. Si la muestra  
 contiene el anticuerpo, se aglutinará el sistema indicador  
 y formará un aglomerado inane con el anticuerpo. Este aglo-  
 merado no se moverá con la solución cromatográfica que se  
 30 desplaza y tendrá lugar un cambio muy pequeño de la mancha.



Sin embargo, si la muestra no contiene el anticuerpo, no se formará aglomerado inmune, y el sistema indicador se moverá entonces con la solución en desplazamiento para formar un dibujo rayado o veteado. Con el fin de realizar un ensayo  
5 de inhibición de aglutinación de tipo cromatográfico, se forma una mota o mancha de aglomerado inmune colocando una gota de una solución que contiene un anticuerpo sobre una mancha de sistema indicador inmunológico depositado. Entonces, una gota de la muestra que se ha de ensayar en cuanto  
10 a la presencia del antígeno es colocada sobre la mancha de aglomerado inmune, y se permite que una solución se desplace por el soporte o, alternativamente, el borde del soporte puede ser puesto directamente en contacto con la muestra para permitir que el antígeno, si está presente, entre en  
15 contacto con la mancha de aglomerado inmune. Si la muestra contiene el antígeno, el aglomerado inmune será disociado debido a la reacción preferente entre el anticuerpo y el antígeno, y el sistema indicador se desplazará y presentará un dibujo veteado. Desde luego, si no está presente ningún  
20 antígeno en la muestra, no se exhibirá desplazamiento de la mancha de aglomerado inmune.

Los objetos y la descripción anteriores son detallados adicionalmente en los siguientes ejemplos, que han de ser considerados solo como ilustrativos y no como limitativos del invento. Las partes son en peso/volumen y las concentraciones de tampón son molares, M, salvo que se especifique lo contrario.

Ejemplo I.- Se preparó un sistema indicador inmunológico utilizando células de Brucella abortus como células  
30 microbianas, bis-diazobencidina (BDB) como agente de copula-



ción, y gonadotropina coriónica humana (CGTH) como antígeno. Este sistema indicador fué depositado entonces sobre un miembro de soporte absorbente, en asociación con el anti-cuerpo para CGTH, y entonces se ensayaron muestras de orina en cuanto a la presencia de CGTH con el dispositivo resultante. Este dispositivo indicador funcionaba por un mecanismo cromatográfico, tal como se describe seguidamente.

Preparación de los reactivos.

10 Solución salina isotónica. Se preparó una solución salina al 0,85 % disolviendo 8,5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada.

Tampón de fosfato. Se preparó una solución tampón 0,15 M de pH 7,4, disolviendo una mezcla seca de 81 % de fosfato ácido disódico y 19 % de fosfato diácido sodico en agua destilada, hasta que se alcanzó el pH deseado.

Solución de bis-diazobencidina. A 0,92 g de bencidina se añadieron 100 ml de agua destilada y 6 ml de ácido clorhídrico 6 N. Se añadió a esta mezcla un volumen adicional de 20 100 ml de agua destilada. Después que se hubo disuelto la bencidina, la solución fué enfriada hasta 0° C en un baño de hielo y sal. Tan pronto comenzaron a formarse cristales de hielo en la solución, se añadieron rápidamente, con agitación, 6,5 ml de una solución al 10 % de nitrito de sodio. 25 Se continuó la agitación hasta que la solución daba resultado negativo frente al papel de almidón y yoduro. Durante la agitación no se debió permitir jamás que la solución alcanzase una temperatura superior a aproximadamente 1° C.

Este material era de color amarillo pálido. Cuando 30 se añadió tampón de fosfato, viró a un color pardo rojizo.



La solución de color amarillo pálido era estable a la temperatura ambiente durante 5 a 7 horas; a 4° C era estable durante aproximadamente 7 días; cuando había sido congelada y almacenada a -20° C, era estable durante aproximadamente 5 60 días; y cuando había sido almacenada por debajo de -35° C, era estable durante al menos 6 meses.

Tratamiento de células microbianas con formalina.

Células de Brucella abortus fueron hechas crecer durante 72 horas a 37° C sobre agar de triptosa y después se separó 10 por lavado el agar con una solución salina al 0,88 ‰, que contenía 1 ‰ de formaldehído. Las células fueron tratadas inmediatamente con formaldehído suspendiéndolas en una solución de formaldehído y solución salina durante 24 horas a la temperatura ambiente (25° C). Entonces, las células fue- 15 rón lavadas a fondo para eliminar el agente de conservación residual. El lavado de las células de Brucella abortus se realizó suspendiendo las células en agua destilada. Las células fueron recogidas por centrifugación y fueron suspendidas de nuevo en agua destilada, repitiéndose varias veces 20 la última operación. Las células conservadas fueron entonces coloreadas.

Coloración de células microbianas tratadas con for-

malina. 2 g de las células de Brucella abortus tratadas con formalina, húmedas y compactadas, 1 ml de sulfato ferroso 25 al 2 ‰ y 5 ml de hematoxilina acuosa al 1 ‰, fueron añadidos a 100 ml de agua destilada y fueron agitados de manera continua durante 24 horas. Las células resultaron coloreadas de manera permanente y el color no fué separado por lavado o lixiviación.

30 Preparación del sistema indicador. (Células microbia-



nas formalinizadas-BDB-CGTH) Células de Brucella abortus, coloreadas con hematoxilina tal como se indica anteriormente, fueron utilizadas como particulas indicadoras de CGTH humana obtenida de la forma Vitamerican Corp. Little Falls, Nueva Jersey. Un volumen de 0,5 g de células coloreadas y compactadas fué añadido a 10 ml de solución salina que contenia 20 mg de CGTH y después se añadieron 12 ml de tampón de fosfato y 40 ml de solución diluida de BDB, preparada mezclando 8 ml de la solución anterior de BDB con 32 ml de tampón de fosfato. La reacción de copulación se desarrolló bajo agitación continua durante 20 minutos a la temperatura ambiente (25° C). El complejo de color pardo resultante fué recogido entonces por centrifugación y fué lavado tres veces por centrifugación con agua destilada. Ya que se deseaba soportar este sistema indicador sobre un miembro de soporte absorbente, una porción de 0,2 g del sistema indicador fué homogeneizada en un mortero o almirez. Se mezcló a fondo con una gota de mertiolato al 1 % y se añadió después lentamente 1 g de jarabe de sacarosa (al 75 % en peso/volumen).

Preparación del anticuerpo para CGTH. Conejos de laboratorio fueron inyectados con CGTH humana en coadyuvante completo de Freund en una serie de inyecciones. Después de un periodo de tiempo dado, los conejos fueron desangrados y el suero que contenia el anticuerpo fué separado del conjunto de la sangre. La CGTH empleada puede proceder de uno cualquiera de los distribuidores comerciales de la misma. Es particularmente útil la vendida por Vitamerican Corp., que tiene una actividad de aproximadamente 2000 - 2500 unidades internacionales (U. I.) por mg. Un procedimiento tipico de inyección y separación del anticuerpo es como sigue: una so-



lución que contenía 10 mg por ml de CGTH en solución salina fue mezclada en proporciones iguales con coadyuvante completo de Freund. 0,1 ml de la mezcla fueron inyectados en cada una de las callosidades de las patas de un conejo que pesaba 3,5 kg. Al final de un periodo de dos semanas, se inyectó intravenosamente una primera inyección de refuerzo o activadora de 0,5 ml de una solución que contenía 5 mg por ml de CGTH en solución salina. Dos días después de la primera inyección activadora o de refuerzo se administró una segunda. Muestras de sangre del conejo fueron tomadas 7 días después de la última inyección activadora de refuerzo. El antisuero tenía un título o concentración de 1/2000, determinado por hemoaglutinación.

Métodos de ensayo. (cromatografico). Una mancha o mota del sistema indicador anteriormente preparado fué colocada aproximadamente a 19 mm. del borde en el interior de una hoja de papel de filtro, y una gota del antisuero anterior fue colocada sobre la misma para formar un aglomerado inmune. Entonces, el borde del papel fué puesto en contacto con una muestra de orina de hebra no embarazada normal. Según ascendía la orina por el papel, la mancha de aglomerado inmune permanecía fija sobre el papel. Esto mostró que el aglomerado inmune formado no era dissociado por los componentes de la orina normal. Se preparó otra tira de papel de filtro con otra mancha de aglomerado inmune y el borde del papel fué puesto en contacto con una muestra de orina de una mujer embarazada. Según ascendía la orina por la tira de papel, se dissociaba una porción del aglomerado inmune y causaba la formación de vetas o el desplazamiento hacia arriba del sistema indicador coloreado desde la mancha de aglomera-



do, cuya intensidad de color fué disminuida o aclarada correspondientemente.

En otro ensayo, las motas o manchas de aglomerado inmune fueron formadas sobre varias tiras de papel, y entonces las muestras de orina fueron aplicadas por goteo sobre estas manchas. Entonces los bordes de las tiras fueron puestos en contacto con solución salina fisiológica. Cuando la solución salina se desplazó fuera de las manchas tratadas con orina de una mujer embarazada, alguna cantidad del sistema indicador coloreado emigró o se desplazó, para producir un dibujo veteado. Se encontró relativamente poca formación de veteado cuando la solución salina se desplazó fuera de las manchas tratadas con orina normal de mujer no embarazada.

Se construyeron dispositivos de análisis para ensayar en cuanto a la presencia del anticuerpo para CGTH humana disponiendo motas o manchas del anterior sistema indicador a aproximadamente 19 mm del borde en el interior de hojas de papel de filtro. Entonces, se colocó una gota de suero de conejo que contenía el anticuerpo sobre una mancha del sistema indicador en una de las tiras, y el borde de la misma fué puesto en contacto con solución salina fisiológica. La solución salina se desplazó fuera de la mancha sin formar vetas del sistema indicador, indicando que se había formado un aglomerado inmune insoluble. Entonces, una gota de suero de conejo normal fue ensayada de manera similar, y se encontró que el sistema indicador emigraba o se desplazaba fuera de la mancha, indicando que no se había formado aglomerado inmune.

El anterior sistema indicador mostró también agluti-



nación por los anticuerpos para CGTH humana en ensayos realizados por aglutinaciones del tipo de tubo. Estas aglutinaciones fueron inhibidas fácilmente añadiendo al medio de ensayo pequeñas cantidades de una solución que contenía CGTH.

5            Cuando se prepara la composición de diagnóstico sobre un soporte absorbente, utilizando un indicador que comprende células microbianas, es esencial que el material celular sea estabilizado por tratamiento con agente de conservación, tal como se describe anteriormente.

10           Se puede construir otro dispositivo indicador mezclando el anterior sistema indicador con el anticuerpo para formar un aglomerado inmune, depositando una única mancha sobre una zona separada del borde de la tira, y secando. Para la utilización, una gota de muestra de orina es colocada  
15 sobre esta mancha o entre esta mancha y el borde, y el extremo o borde de la tira es colocado en una solución salina. Si la orina contiene CGTH, se disociará el aglomerado para permitir que el sistema indicador coloreado se mueva con la solución salina y presente un aspecto veteado. Si no existe  
20 CGTH presente, no habrá cambio.

          Alternativamente, la muestra de orina puede ser utilizada en calidad de solución cromatográfica igual que anteriormente. En una realización preferida, dicho dispositivo se construye preparando el reactivo de diagnóstico en forma  
25 de tira la cual a título de ejemplo, comprende colocar una banda del sistema indicador y aglomerado de anticuerpo a aproximadamente 15 mm del borde largo de una hoja de 15 cm por 26 cm de papel de filtro Eaton-Dikeman número 609, dejaran secarse al reactivo a la temperatura ambiente, cortar  
30 el papel a lo ancho en forma de tiras, y almacenar en reci-



pientes apropiados hasta la utilización.

Se apreciará fácilmente que se pueden utilizar muchos materiales diferentes en el ensayo de tira absorbente. Por ejemplo, se pueden utilizar muchos tipos de materiales cromatográficos, así como muchos tipos de fluidos cromatográficos reveladores.

Ejemplo II.- Se emplearon células de Escherichia coli como partículas indicadoras para construir un sistema indicador inmunológico de células microbianas-BDB-CGTH. Se empleó este sistema indicador juntamente con el anticuerpo para CGTH para establecer un ensayo de aglutinación del tipo para portaobjetos, y se realizaron con él las evaluaciones clínicas de embarazo.

Preparación de reactivos.

Solución salina al 0,85 ‰. 68 g de cloruro de sodio fueron disueltos en 8 litros de agua destilada y la solución fue tratada en autoclave a 1,05 kg/cm<sup>2</sup> manométricos y 250° C durante 30 minutos. Después fue enfriada y almacenada a 4° C. El tratamiento en autoclave se realizó para esterilizar la solución salina.

Solución de formaldehído al 1 ‰. Una solución de formalina al 37 ‰ fué tratada añadiendo a la solución carbonato de calcio pulverizado, y dejándola reposar durante 24 a 48 horas. El líquido flotante fue vertido entonces en otro recipiente, y fue filtrado tres veces a través de papel de filtro blanco de alta calidad, con superficie rugosa o acresponada. Cuando el pH era menor de aproximadamente 7,0, se ajustó a este pH con solución de NaOH al 0,1 ‰. Una cantidad suficiente de esta solución tratada de formalina al 37 ‰ fue añadida a agua destilada para obtener una solución



al 1%.

Solución tampón de fosfato. Se prepararon 100 ml de un tampón de fosfato de pH 7,4, mezclando 80,8 ml de una solución de fosfato de sodio con 19,2 ml de una solución de fosfato de potasio a 20°C. La solución de fosfato de sodio contenía 53,726 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  por litro de agua destilada. La solución de fosfato de potasio contenía 20,414 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por litro de agua destilada.

Bisdiazo-bencidina. (BDB). 0,640 g de bencidina.

2HCl fueron disueltos en 100 ml de una solución de HCl al 0,56% en un matraz Erlenmeyer de Pyrex de 250 ml. Este matraz fue colocado sobre una bandeja o cubeta plana con agitación magnética, rellena de hielo, con un agitador magnético sumergido en la solución. Cuando la temperatura llegó a 4°C, se recogió con una pipeta serológica una parte alícuota de 5 ml de solución de nitrito de sodio a 4°C, preparada añadiendo 0,680 g de  $\text{NaNO}_2$  a 10 ml de agua destilada, y se añadió gota a gota, a la solución de bencidina de forma uniforme durante un periodo de 7 a 10 minutos, moviéndose el agitador magnético a 200 rpm (una gota cada 4 a 6 segundos) Esta solución fue agitada de manera continua durante 20 minutos, después de cuyo tiempo fue congelada inmediatamente y mantenida a -60°C en un cierto número de viales de 4 g. Esta solución es susceptible de descomponerse incluso entre 0 y 5°C y por lo tanto se utilizó la congelación para mantener la estabilidad. Se puede calentar hasta la temperatura de utilización cuando se necesite.

Anticuerpo para CGTH. Se preparó una emulsión que contenía 10 mg de CGTH por ml disolviendo 100 mg de CGTH purificada en 5 ml de la solución salina anterior, añadien



do 5 ml de coadyuvante completo de Freund mezclado a fondo, y agitando para producir una emulsión homogénea. Una cantidad de 0,2 ml de la emulsión fue inyectada en cada una de las callosidades de las patas de un conejo sano, mantenido en un ambiente normal de laboratorio, con un total de 0,8 ml de la emulsión (8 mg de CGTH).

Seguidamente, se administraron al conejo una serie de inyecciones, que consistían cada una en 0,5 ml de una solución preparada disolviendo suficiente cantidad de CGTH purificada en la solución salina al 0,85%, para obtener una concentración de 5 mg por ml. Las inyecciones fueron administradas en las venas del oído. Estas inyecciones subsiguientes fueron administradas en los siguientes días después de la primera inyección de emulsión: días 22, 24, 38, 40, 71 y 73. Se recogieron del conejo dos muestras de 40 a 50 ml de sangre por punción cardíaca, cada uno de los días 50 y 83. Entonces, los glóbulos de estas muestras fueron separados del suero de cada muestra dejando que la sangre se coagulase en un tubo de centrífuga a aproximadamente 25°C durante aproximadamente 2 horas, entonces el suero flotante fue colocado en un tubo de pequeño diámetro (menor de 30 mm) y el tubo fue sumergido durante 30 minutos en un baño de agua a 56°C.

Entonces se añadieron 10 mg de glóbulos rojos de oveja formalinizados (liofilizados) por cada ml de la muestra de suero, y fueron mezclados durante 15 minutos a aproximadamente 25°C para adsorber anticuerpos heterófilos del suero. Entonces el suero adsorbido fue separado de las células por centrifugación con una aceleración aproximadamente 1000 veces la de la gravedad.

341495



20

Se preparó para esta adsorción una cantidad de 40 ml de globulos o células de oveja compactadas, centrifugando y separando con sifón o por descarga sifónica el líquido flotante de 200 ml de glóbulos rojos de oveja de nueva espor  
5 tación, dispersados en una solución de Alserver, y lavando después de esto tres veces con solución salina al 0,85%, utilizando 120 a 200 ml de solución salina por lavado. A estas células se añadieron 460 ml de la anterior solución salina y 500 ml de una solución de formalina al 3% con pH  
10 7,3. La suspensión resultante fue mezclada y dejada reposar durante 18 a 20 horas a 37°C. Entonces, las células fueron separadas por centrifugación y lavadas 5 veces con aproximadamente 200 ml de agua destilada por lavado. Se añadió suficiente cantidad de agua destilada para obtener una suspen  
15 sión al 10% de las células. Esta suspensión fue almacenada a 4°C hasta su utilización para la adsorción.

Células microbianas. Se obtuvieron células de E. Coli cultivando una mucosa intestinal de un conejo de laboratorio muerto en un caldo de cultivo de infusión de cerebro  
20 y corazón (I.C.C.). Un volumen de 68 ml de un cultivo bien desarrollado (durante 18 horas) fue utilizado para inocular 3 litros de ICC que había sido investigado previamente en cuanto a esterilidad. Entonces las células fueron incubadas durante 4 1/2 horas a 37°C con agitación. Se encontró  
25 que las células resultantes eran de tamaño y forma uniformes.

Preparación del sistema indicador. Los 3 litros de células de E. Coli suspendidas fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos para separar el fluido en exceso de  
30 las células compactadas. El líquido flotante fue separado

341495



8

con sifón o descarga sifónica y las células compactadas re-  
manentes fueron puestas en contacto con aproximadamente 45  
ml de solución de formaldehído al 37% tratada con carbonato  
de calcio, con el fin de asegurar la destrucción o muerte  
5 de las células de E. Coli. Se dejó que la formalina permaneciese en contacto con las células durante una hora, después de cuyo tiempo las células fueron lavadas tres veces con la anterior solución salina, y después de esto fueron suspendidas en 1600 ml de solución de formaldehído al 1%  
10 durante 41 horas a la temperatura ambiente (25°C), Entonces estas células fueron centrifugadas y recuperadas en forma de células compactadas tratadas con agente de conservación. Estas células compactadas fueron suspendidas entonces de nuevo con 500 ml de la anterior solución salina, y fueron almacenadas a 4°C. La concentración de células era de  
15 4,5, medida en un hematócrito.

Una porción de la anterior suspensión de células fue centrifugada para recuperar un volumen de células compactadas, y se retiraron 0,5 ml de las células compactadas  
20 y se añadieron a 10 ml de la anterior solución salina a la que se habían añadido 20 mg de CGTH, 12 ml del tampón de fosfato y 40 ml de solución diluída de EDB, preparada combinando 8 ml de BdB con 32 ml del tampón de fosfato. El CGTH tenía una actividad de 3600 U.I. por mg y se obtuvo de la firma Vitamerican Corp. Esta mezcla fue agitada de forma  
25 continua durante 20 minutos a la temperatura ambiente, y después de esto se recuperó por centrifugación el sistema indicador formado, y se lavó tres veces con la solución salina anterior y después de esto se centrifugó y volvió a suspender en una  
30 dilución de 1:50 de albúmina de suero bovino (al 30%) en la

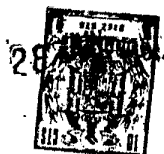


solución salina anterior. La albúmina de suero bovino, ASB, fue obtenida de la firma Armour and Co.

5 La suspensión resultante del sistema indicador exhibía un color parduzco y se encontró que era estable por todo un amplio margen de temperaturas.

Experimentación preliminar con el sistema indicador.  
Para determinar las cantidades menores de CGTH susceptibles de ser detectadas, se prepararon muestras de orina normal, añadiendo a las mismas cantidades conocidas de CGTH. Enton-  
10 ces, el sistema indicador anteriormente preparado se empleó juntamente con el anterior anticuerpo para CGTH (Ac-CGTH) para realizar ensayos de aglutinación del tipo para porta-  
objetos.

15 Para esta experimentación, el anterior sistema indi-  
cador fue suspendido de nuevo en suficiente cantidad de so-  
lución salina y de ASB 1:50 para obtener una concentración de 8% de células. Seguidamente, se prepararon tres dilucio-  
nes de la anterior solución de anticuerpos, diluyendo una  
20 parte de la solución de anticuerpos con 250 partes de la  
solución salina anterior, con 500 partes de la solución sa-  
lina, y con 1000 partes de la solución salina. Estas dilu-  
ciones fueron tituladas, respectivamente, como de 1:250 y  
1:500 y 1:1000. Se prepararon muestra de orina, con cada  
una de las siguientes concentraciones de CGTH, añadiendo  
25 0,25 ml de una solución de reserva de 4 mg de CGTH/ml de so-  
lución salina (3600 U.I./mg) a 100 ml de una muestra de ori-  
na de hembra normal no embarazada, y diluyendo después en  
serie con solución salina: con 2,25, 4, 5, 6, 9, 18 y 36  
U.I. de CGTH/ml de orina y solución salina. Se dejó a un la-  
30 do, en calidad de testigo o comparación, una porción de la



muestra de orina.

Una gota de cada una de las muestra de orina fue mez  
 clada con una gota de la dilución apropiada de anticuerpos,  
 y fue mezclada sobre un portaobjetos. Después de esto, se  
 5 añadió a las células, que ya se encontraban sobre el porta-  
 objetos, una gota de la anterior suspensión al 8,3 de siste-  
 ma indicador, y se mezcló. Los resultados de esta serie de  
 ensayos estan indicados en la tabla 1, siguiente, en que  
 " - " representa aglutinación y por lo tanto un dibujo gra-  
 10 nulado en la suspensión que se encuentra sobre el portaobje-  
 tos, y " + " representa un dibujo no aglutinado liso sobre  
 el portaobjetos.

TABLA I

15	Concentración de CGTH en la orina U.I./ml.	Diluciones de Ac-CGTH		
		1:250	1:500	1:1000
	0 Testigo o con- troll	-	-	-
	2.25	-	-	-
	4.5	-	-	+
20	6.0	-	+	+
	9.0	+	+	+
	18.0	+	+	+
	36.0	+	+	+

25 La tabla 1 muestra que cuando no está presente CGTH  
 en la orina, hay aglutinación debido al hecho de que la mues-  
 tra de orina no contiene CGTH que puede reaccionar preferen-  
 temente con el Ac-CGTH, y de esta manera el anticuerpo se  
 aglutina con el sistema indicador, y forma un dibujo o aspec-  
 30 to granulado de células aglomeradas o arracimadas sobre la

341495



20

porción humedecida del portaobjetos. Añadiendo 2,25 U.I./  
ml de CGTH a la muestra de orina, todavía hay suficiente  
Ac-CGTH presente en el sistema para reaccionar con todo el  
CGTH y causar la aglomeración de las células, o aglutinación,  
5 incluso en la dilución 1:1000. Cuando se ensayó la muestra  
de orina que contenía 4,5 U.I./ml con las tres diluciones  
de Ac-CGTH, el anticuerpo había reaccionado totalmente con  
el CGTH entre las diluciones de 1:500 y 1:1000, de forma que  
el dibujo de la dilución 1:1000 no es granulado sino que es  
10 un dibujo liso de células de sistema indicador suspendidas  
indicando que no hay aglutinación. Se puede observar que  
con 6,0 U.I. de CGTH/ml, la cantidad necesaria de anticuerpo  
se presenta entre las diluciones de 1:250 y 1:500 tal como  
se podía esperar, ya que está presente una mayor cantidad  
15 de CGTH, y por lo tanto es necesaria una cantidad mayor  
de Ac-CGTH para reaccionar completamente con el CGTH, con  
el fin de hacer que aparezca un dibujo granulado con la dilución  
1:250. A partir de la tabla 1 se puede observar entonces que se  
pueden detectar cantidades muy pequeñas, de  
20 aproximadamente 4,5 U.I. de CGTH/ml de orina, utilizando bajas  
concentraciones de Ac-CGTH en el sistema de ensayo, a saber  
diluciones de 1:1000 o menores. Se ha encontrado también que  
doblado la cantidad de orina utilizada hasta dos gotas, se  
pueden detectar cantidades tan pequeñas como 2 U.  
25 I. de CGTH/ml de orina.

Con el fin de ensayar los tiempos exactos de formación de los dibujos granulados en un margen de concentraciones de Ac-CGTH y de células, se llevó a cabo la siguiente experimentación adicional.

30 Porciones de sistema indicador fueron suspendidas

341495



de nuevo en suficiente cantidad de la anterior dilución  
1:50 de ASE en solución salina, para preparar concentracio-  
nes de 0,625%, 1,25%, 2,5% y 5% de células. Seguidamente,  
se prepararon una serie de diluciones de solución de Ac-  
5 CGTH con la anterior ASE 1:50 en solución salina, para obte-  
ner diluciones de 1:125, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000,  
1:4000, 1:8000 y 1:16000. Se aplicaron por goteo 4 gotas de  
cada una de las diluciones de Ac-CGTH en filas paralelas se-  
paradas, a lo largo de la superficie de una placa de vidrio  
10 con trama de rayas cruzadas. A la primera gota de cada una  
de estas diluciones se añadió una gota de la concentración  
más baja de suspensiones de células de sistema indicador.  
A la segunda gota de cada una de las diluciones de Ac-CGTH  
se añadió una gota de la suspensión al 1,25%, y a la terce-  
15 ra y cuarta gotas de cada una de las diluciones se añadió,  
respectivamente, una gota de las suspensiones de células al  
2,5% y al 5%. Los resultados están mostrados en la tabla 2  
siguiente, en la cual está dado en segundos el tiempo nece-  
sario para la formación de un dibujo de aglutinación granu-  
20 lado, para cada una de las mezclas de ensayo. Una "S" indi-  
ca que había cantidad insuficiente de AC-CGTH en la dilu-  
ción particular de anticuerpos, para producir la aglutina-  
ción de las células, y por lo tanto el dibujo permanecía li-  
so.



TABLA II

Tiempos de aglutinación, segundos

Siste- ma In- dicador	Dilución de Ac-CGTH								
	Concen- tración %	1:125	1:250	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
5	0.625	34	50	213	85	107	280	S	S
	1.25	31	30	36	58	56	150	120	S
	2.5	25	31	43	62	92	140	S	S
10	5.0	35	30	55	60	75	S	S	S

Los tiempos necesarios para la aglutinación, regis-  
trados en la tabla 2, muestran que es necesario un periodo  
de tiempo relativamente corto para determinar el fenómeno  
de aglutinación el cual, en un ensayo real, representa un  
resultado negativo en cuanto al embarazo. Por lo tanto, se  
puede descartar el embarazo mediante un ensayo de aglutina-  
ción en portaobjetos con el anterior sistema indicador, en  
aproximadamente 1 minuto o menos. Este es un periodo de  
tiempo mucho más corto que el que se requiere para los sis-  
temas de aglutinación del tipo de tubo, basados en glóbulos  
rojos. Igualmente, los dibujos que distinguen la aglutina-  
ción de la no aglutinación están marcados muy claramente,  
y estos ensayos no muestran esencialmente dibujos dudosos  
intermedios. De esta manera, es posible seleccionar los  
reactivos de manera que se puedan obtener los dibujos cla-  
ramente definidos requeridos para el diagnóstico del embara-  
zo.

La tabla 2 muestra también que se puede emplear un  
amplio margen de diluciones de AC-CGTH, igual que un amplio

341495



margen de concentraciones de indicador. La concentración del sistema indicador en dilución 1 : 50 de ASB en solución salina puede ser desde menos de 1,5 hasta aproximadamente 12,5 para un sistema de ensayo apto para ser utilizado.

5           Con el fin de ensayar el sistema indicador del ejemplo II con 16 muestras reales de orina, se obtuvieron muestras de orina de 16 hembras no embarazadas, cuatro de las cuales desarrollaban programas regulares de píldoras anti-conceptivas. El método de experimentación era el mismo que se indicó anteriormente. Esto es, una gota de la muestra de orina fue mezclada con una gota de una dilución 1 : 1000 de Ac-OGH, y después se colocó una gota de esta mezola sobre un portaobjetos de vidrio y a la mezola, ya presente sobre el portaobjetos, se añadió una gota de una suspensión al 4,5 del anterior sistema indicador. En todos los 16 casos se encontró un dibujo granulado que indicaba aglutinación, y por lo tanto ausencia de embarazo. Este tipo de experimentación da una evidencia limitada de que los resultados positivos falsos no constituyen una dificultad del anterior sistema indicador, y que para este tipo particular de experimentación, no interfieren los niveles de hormonas que resultan de programas anticonceptivos activos.

10  
15  
20

Ensayos clínicos utilizando un sistema indicador.

Se recibieron 31 muestras congeladas de orina y se realizaron ensayos en forma de un estudio a ciegas, en el cual eran desconocidos los estados de las pacientes de las que se habían tomado las muestras. Se incluyó en calidad de testigo o control una muestra de orina de hembra embarazada conocida, y en calidad de otro testigo o control se incluyó una muestra de orina de hembra no embarazada conocida. Se

25  
30



realizaron ensayos en portaobjetos de la manera anterior, y se compararon con ensayos en portaobjetos realizados sobre las mismas muestras de orina con un ensayo de embarazo en portaobjetos, comercialmente disponible, basado en un sistema indicador de partículas de látex en combinación con OGH.

El sistema indicador se utilizó en la forma de una suspensión al 4 %. La solución de anticuerpos consistía en una dilución de 1 : 1000 de la anterior solución de anticuerpos en solución salina. El procedimiento de ensayo consistía en mezclar una gota de cada una de las muestras de orina junto con una gota de la solución de anticuerpos y colocar entonces una gota de esta mezcla sobre una superficie limpia de portaobjetos de vidrio, añadir a esto una gota de la suspensión de sistema indicador al 4 %, y mezclar. Entonces los resultados se registraron como positivos, + , por la presencia de un dibujo liso que mostraba que la aglutinación había sido inhibida e indicando por lo tanto embarazo, y como negativos, - , por la presencia de un dibujo granulado que mostraba aglutinación, e indicando por lo tanto ausencia de embarazo.

El ensayo comercialmente disponible se realizó ajustándose estrictamente con las instrucciones contenidas en el envase, y se registraron los resultados con respecto a la presencia o ausencia de embarazo. Los resultados fueron los indicados en la tabla 3 siguiente.

341495



TABLA 5  
RESULTADOS DE ESTUDIOS CLINICOS

	<u>Muestra de orina incognita n°</u>	<u>Sistema indicador del Ejemplo II</u>	<u>Ensayo comercial en cuanto a embarazo.</u>
	1	+	-
5	2	+	-
	3	+	+
	4	+	+
	5	+	+
	6	+	-
10	7	+	+
	8	+	no se efectuó
	9	+	+
	10	+	-
	11	+	-
15	12	+	+
	13	+	+
	14	+	+
	15	+	±
	16	+	-
20	17	+	-
	18	+	-
	19	+	+
	20	+	-
	21	+	+
25	22	+	no se efectuó
	23	+	-
	24	+	+
	25	+	-
	26	+	+
30	27	+	+

341495



(Tabla 3 continuación)

Muestra de orina incognita nº	Sistema indicador del Ejemplo II	Ensayo comercial en cuanto a embarazo
28	±	±
29	±	±
30	±	no se efectuó
31	±	no se efectuó

A partir de la tabla anterior, se puede observar que todas las 31 muestras de orina indicaron ser de mujeres embarazadas, de acuerdo con el sistema indicador del ejemplo II. Once de las 27 muestras de orina que fueron ensayadas con el ensayo de embarazo comercialmente disponible indicaron ser negativas, indicando ausencia de embarazo. Cuando se reveló el secreto, se descubrió que todas las muestras de orina desconocidas procedían de hembras embarazadas, variando la gestación entre unas pocas semanas y 8-1/2 meses.

La orina de hembra embarazada y la orina de hembra no embarazada conocida fueron ensayadas solo con el sistema indicador del ejemplo II, y por lo tanto no fueron incluidas en la tabla 3. Tal como era de esperar, los resultados eran uno negativo para la orina de hembra no embarazada y uno positivo para la orina de hembra embarazada que se encontraba en la octava semana de gestación.

Ejemplo III.- A diferencia del Ejemplo II anterior, se preparó un sistema indicador de acuerdo con una reacción de dos etapas, añadiendo en primer lugar las células de E. Coli a una solución tampón, y añadiendo después de esto una solución de EDB para formar un indicador inmunológico. Para preparar un sistema indicador, se añadió después una solución de CCFH, y se llevó a cabo la reacción de copulación.



### Preparación de reactivos

Tampón de fosfato y solución salina, pH 7,0. 150 ml de una solución de fosfato disódico y solución salina se valoraron hasta pH 7, con 75 ml de solución de fosfato monosódico y solución salina. La primera solución fué preparada mezclando 150 ml de solución 0,5 N de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  con 350 ml de agua destilada desionizada, y 500 ml de solución salina al 0,85  $\mu$ . Se preparó la solución de fosfato monosódico y solución salina mezclando 150 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,5 M., con 350 ml de agua desionizada destilada y 500 ml de solución salina al 0,85  $\mu$ .

Tampón de fosfato y solución salina, pH 7,5. Se valoraron hasta pH 7,5, 180 ml de la anterior solución salina de fosfato disódico, con la anterior solución salina de fosfato monosódico.

Solución de BDB. Se añadió un volumen de bencidina.  $2\text{HCl}$  0,025 M en  $\text{HCl}$  0,36 M, a un volumen de  $\text{NaNO}_2$  0,1 M en agua desionizada destilada, y se dejó reaccionar durante 2 minutos a la mezcla resultante. Esta fue valorada entonces hasta pH 7,0, con una mezcla de volúmenes iguales del anterior tampón de fosfato y solución salina, de pH 7,0, y  $\text{NaOH}$  0,31 M en agua destilada. Inmediatamente después de esto, partes alicuotas de 6 ml y 2 ml de la solución de BDB fueron colocadas en recipientes que fueron tapados, cerrados herméticamente y congelados hasta  $-83^\circ \text{C}$ . El BDB fué descongelado hasta  $4^\circ \text{C}$  cuando era necesario.

Células de E.Coli fueron formalinizadas de la manera indicada en el Ejemplo II y entonces fueron preparadas en forma de una suspensión de células al 1,4  $\mu$ , y fueron introducidas con pipeta en un tubo de centrifuga de 50 ml,



y fueron centrifugadas a 3100 rpm. durante 15 minutos. Entonces se desechó el líquido flotante, y las células compactadas fueron suspendidas de nuevo mezclando en primer lugar en un mezclador de torbellino o ciclón, hasta que fué visible un preparado homogéneo, y añadiendo entonces 20 ml de la solución salina del Ejemplo II. Entonces las células fueron centrifugadas y se desechó un líquido flotante. Se repitió este lavado con solución salina con dos lavados adicionales. Una cantidad de 0,2 ml de las células compactadas resultantes fue suspendida entonces en 2 ml de la anterior solución salina. Entonces, esta suspensión fué almacenada a 4° C durante 1 hora. Después de este tiempo, se añadieron 2 ml de una dilución 1 : 5 de la anterior solución de BDB en la solución de fosfato del Ejemplo II, y se colocaron en un agitador rotatorio a 4° C durante 30 minutos en la oscuridad. Entonces, las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 4° C y fueron lavadas dos veces con 4 ml de tampón frío de fosfato y solución salina, de pH 7,5, para producir una suspensión relativamente estable.

Después de esto, se añadieron a la suspensión de células 1,6 ml de tampón frío de fosfato y solución salina de pH 7,5 y 0,8 ml de CGTH en 6 ml de solución salina (4 mg/ml). Se preparó para la experimentación el sistema indicador resultante lavando el preparado una vez con 25 ml de ASB 1 : 50 en solución salina, centrifugando a 3000 rpm durante 5 minutos y volviendo a suspender en un mezclador de torbellino o ciclón. Se añadió entonces 0,5 ml de solución de ASB 1 : 50 en solución salina para volver a suspender el sistema indicador para almacenar en un refrigerador. Una porción de 0,5 ml de la anterior preparación fué colo-



cada en un agitador a la temperatura ambiente durante 4 horas. Después, la suspensión fue colocada en un agitador a 37°C durante 1 hora. Después la suspensión fue lavada dos veces en la anterior solución salina y una vez con ASB 1:50 en solución salina. Después las células fueron suspendidas de nuevo hasta 0,5 ml en ASB 1:50 en solución salina, para dar una concentración de 10<sup>6</sup> de células.

Después de esto, se llevó a cabo un ensayo de aglutinación indirecta mezclando una gota de la suspensión de células con una gota de cada una de 3 diluciones crecientes de solución de anticuerpos. Las diluciones eran de 1:250, 1:500 y 1:1000. Se formó un dibujo liso, indicando una buena aglutinación indirecta, para ambas diluciones de 1:1000, aunque no tan fuerte como las otras dos, se consideró que era una aglutinación homogénea. Esto demuestra que el material indicador del presente invento puede ser preparado y almacenado separadamente y empleado después de esto para copular materiales antigénicos que pueden ser utilizados posteriormente para la experimentación.

Ejemplo IV.- Se preparó un sistema indicador inmunológico para ensayar muestras de orina en cuanto a la presencia de CGTH, copulando CGTH humana sobre células de levadura mediante el agente copulador químico BDE. Se utilizó el sistema indicador en unión con el anticuerpo para CGTH, para desarrollar un ensayo de inhibición de la aglutinación.

Se pesó 1 g (1.0 g) de Saccharomyces cerevisiae, y se lavó tres veces con 200 ml de la anterior solución salina. La levadura empleada era la vendida bajo la designación comercial Levadura Seca Activa de Fleischmann. Entonces las células de levadura fueron suspendidas de nuevo en 400

26



5 ml de solución de formaldehído al 1,5 en solución salina. La suspensión fue dejada a la temperatura ambiente durante 24 horas, con agitación ocasional. Entonces las células fueron centrifugadas a 2000 rpm. durante 10 minutos y el volumen de células compactadas fue retirado y almacenado en 200 ml de la solución salina anterior a 4°C. Esta suspensión mostró un valor de 1,45 en el hematócrito.

10 A 0,5 ml de las células de levadura formalizadas compactadas se añadieron 12 ml del anterior tampón de fosfato, y después 6 ml de una solución salina que contenía 20 mg de CGTH/10 ml, y después de esto las células fueron puestas en contacto con 40 ml de una dilución 1:5 de la anterior solución de BDB. La reacción transcurrió con agitación continua durante 20 minutos a la temperatura ambiente. Se recogió el sistema indicador resultante por centrifugación, y lavando tres veces en la anterior solución salina, y después de lo cual las células compactadas fueron suspendidas de nuevo en una dilución 1:50 de ASB en solución salina. La suspensión resultante mostró un valor de 6,5 en el hematócrito.

15

20

Esta suspensión de células al 6,5 fue utilizada entonces con una dilución de 1:500 de Ac-CGTH para ensayar en cuanto a la presencia de CGTH en dos muestras de orina. Una porción de 0,2 ml de la suspensión de células al 6,5 fue lavada una vez y fué diluída con dilución 1:50 de ASB en solución salina hasta la concentración original, con el fin de tener un volumen final de 0,2 ml. Una gota de una muestra de orina de hembra embarazada conocida fue mezclada a una gota de la solución de Ac-CGTH y fue dejada durante 2 minutos, y después se colocó sobre un portaobjetos de vidrio

25

30

341493



una única gota de la mezcla. Entonces, una gota del sistema  
indicador fue mezclada con el material sobre el portaobjetos.  
Apareció un dibujo liso indicando embarazo. Se repitió el  
ensayo con una orina de hembra no embarazada, y se formó un  
5 dibujo aglutinado granuloso en un corto tiempo.

Este ejemplo ilustra que se pueden utilizar células  
de levadura en calidad de partículas indicadoras para los  
sistemas indicadores. Estas células ofrecen la ventaja de  
encontrarse actualmente disponibles comercialmente en una  
10 forma seca y estable.

Ejemplo V.- Se preparó un sistema indicador utili-  
zando E. Coli en calidad de células microbianas, una carbo-  
diimida como agente de copulación, y CGTH como sustancia an-  
tigénica. Se utilizó entonces este sistema indicador para  
15 ambos ensayos de aglutinación y de inhibición de la agluti-  
nación.

Preparación de reactivos.

Células microbianas. Se hicieron crecer células de  
E. Coli, se cosecharon y trataron con formaldehído de la ma-  
20 nera descrita en el Ejemplo II. Se preparó de esta manera  
un volumen de 20 ml de una suspensión al 2,5%. Esta suspen-  
sión fue centrifugada y se recuperaron 0,5 ml de células com-  
pactadas, para utilizarse en la preparación del sistema in-  
dicador.

Agente de copulación. Se disolvieron 0,2 g de N,N'-  
díciclohexil carbodiimida en 0,5 ml de tetrahidrofurano, y  
después se añadieron a la solución 1,0 ml de agua destila-  
da.

Sustancia antigénica. Se disolvieron 40 mg de CGTH  
30 en 2 ml de agua destilada. El CGTH utilizado tenía una acti-

341495

vidad de 2590 U.I./mg y se obtuvo de la firma Vitamerican Corp. Little Falls, Nueva York, o Nueva Jersey.

Solución de Ac-CGTH. Se utilizaron porciones de la solución de anticuerpos y de la solución salina al 0,85% preparadas para el Ejemplo II, para preparar diluciones de 1:50, 1:100 y 1:200 de la Ac-CGTH.

Preparación del sistema indicador. El volumen de 0,5 ml de células compactadas de E. Coli fue lavado 5 veces con agua fría y fue suspendido después en los 2 ml de solución de CGTH. Entonces, la solución de agente de copulación fue añadida a las células suspendidas y al CGTH, con el fin de copularlos. La mezcla fue agitada y después fue dejada reposar durante 24 horas a 25°C. Se realizaron entonces los siguientes lavados para liberar al sistema indicador formado de cualesquiera impurezas arrastradas: 3 veces con solución 0,01M de carbonato de sodio, 3 veces con HCl 0,01 M, 3 veces con agua destilada, 1 vez con NaCl al 1% (pH 2,3) 1 vez con una dilución de 1:20 del fosfato y solución salina del Ejemplo III en solución salina al 0,85% (pH 7,0), y 1 vez con una dilución de 1:50 de ASB en solución salina al 0,85%. El sistema indicador lavado fue suspendido entonces de nuevo hasta una concentración de 8% de células en dilución 1:50 de ASB en solución salina de 0,85%. Esta suspensión al 8% fue almacenada en una cámara frigorífica y fue retirada para la experimentación, tal como se indica seguidamente.

Se realizó una aglutinación preliminar mezclando una gota de cada una de las anteriores diluciones de anticuerpos con una gota de la suspensión de sistema indicador en zonas separadas sobre una placa de vidrio. Se realizó un ensayo

341495



testigo mezclando una gota de una dilución de 1:50 de suero de conejo normal (SCN), en solución salina al 0,85%, con una gota de la suspensión de sistema indicador en una zona separada de la misma placa. Los resultados están indicados en la Tabla 4 siguiente, en la cual la letra "L" designa un dibujo liso y por lo tanto no aglutinado, y la "G" designa un dibujo granulado y por lo tanto aglutinado.

TABLA IV

10

Ensayos de aglutinación indirecta				
Sistema indicador	Diluciones de anticuerpo			Testigo o control SCN
	1:50	1:100	1:200	
Ejemplo V, 8%	G	G	L	L

15

La tabla 4 muestra que tuvo lugar aglutinación con las diluciones 1:50 y 1:100 pero que estaba presente una cantidad insuficiente de Ao-CGTH en la dilución de 1:200 para producir la aglutinación del sistema indicador. El ensayo testigo o de comparación mostró un dibujo liso, indicando que el sistema no se aglutina espontáneamente con la solución de SCN.

20

Se realizó un experimento adicional mezclando 0,5 ml de una muestra de orina de hembra embarazada con 0,5 ml de la dilución de 1:100 de anticuerpo en un tubo de ensayo, y dejando reposar a esta mezcla durante 5 minutos a 25°C. Entonces se retiró una gota del tubo de ensayo y se mezcló con una gota de la suspensión al 8,5 de sistema indicador sobre un portaobjetos de vidrio. Se observó un dibujo liso, "L", indicando que la aglutinación del sistema indicador por

30

344495



el Ac-CGTK había sido inhibida por el CGTH presente en la muestra de orina.

Se repitió el ensayo utilizando 0,5 ml. de una muestra de orina de hembra no embarazada con el resultado de que en un corto tiempo se desarrolló un dibujo granular, "G".

Este ejemplo muestra que se puede emplear una carbodiimida en calidad de agente de copulación para unir sustancias antigénicas con células microbianas.

Ejemplo VI. Se prepararon dos sistemas indicadores adicionales de acuerdo con el Ejemplo V. Los antígenos utilizados fueron albúmina de suero humano (ASH) y gamma-globulina de caballo. El sistema indicador para ASH se preparó utilizando 10 mg de ASH por 0,25 ml. de volumen de células compactadas de E. Coli en lugar del CGTH. El sistema indicador para la gamma globulina de caballo se preparó utilizando 40 mg de este antígeno por 0,25 ml. de volumen de células compactadas de E. Coli en lugar del CGTH.

Se realizó un ensayo de aglutinación mezclando una gota de cada uno de los sistemas indicadores preparados, con una gota de una dilución de 1:10 de sus respectivos antisueros en solución salina al 0,85%. Se preparó una muestra testigo de comparación para cada ensayo utilizando una gota de una dilución de 1:10 de suero de conejo normal en solución salina al 0,85%.

Cada una de las gotas de antisuero produjeron un buen dibujo de aglutinación de los respectivos sistemas indicadores. El suero de conejo normal no produjo aglutinaciones.

Ejemplo VII.- Se repitieron los sistemas indicadores y los ensayos de aglutinación del Ejemplo VI, con resul

341495



tados idénticos, utilizando perclorato de N-t-butil-5-metil-isoxazolio, en lugar del agente de copulación de carbodiimida.

5 Se utilizó este agente de copulación tomando 10 ml  
de una suspensión al 2,5% de las células formalinizadas del  
Ejemplo II y centrifugando durante 5 a 10 minutos para sepa  
rar la solución flotante. Entonces, las células fueron lava  
das cuatro veces con agua fría y después fueron suspendidas  
de nuevo en 20 ml de bicarbonato de sodio al 0,1% en agua  
10 destilada. Se añadió entonces una cantidad de 3 mg de anhí-  
drido succínico, y se agitaron las células durante la noche  
a 4°C. Las células fueron entonces centrifugadas y lavadas  
tres veces adicionales con agua, después de lo cual las cé-  
lulas succiniladas fueron suspendidas de nuevo en 5 ml de  
15 agua destilada. Se utilizó entonces una pipeta para añadir  
a las células 10 microlitros de trietilamina. Seguidamente  
se añadieron 17 mg de perclorato de N-t-butil-5-metilisoxa-  
zolio. Este agente de copulación es conocido también como  
Reactivo "L" de Woodward. El indicador inmunológico así for  
20 mado fue utilizado para copular los antígenos indicados en  
el Ejemplo VI en las cantidades allí dadas. La albúmina de  
suero humano y la gamma globulina de caballo copuladas con  
E. Coli por el método anterior, dieron aglutinaciones cuau  
do reaccionaron con una dilución de 1:10 de anti(albumina de  
25 suero humano) de conejo y una dilución de 1:10 de anti(ga-  
mma globulina de caballo) de conejo. No se produjo aglutina-  
ción por parte de la dilución de 1:10 de suero de conejo  
normal.

30 Ejemplo VIII.- Se prepararon 12 sistemas indicado-  
res diferentes siguiendo el Ejemplo II en cuanto a la mane-



7  
5  
ra de formalinizar las células microbianas y copular anti-  
genos con las mismas utilizando BDB. Las células microbia-  
nas utilizadas fueron: Bacillus subtilis, Bacillus pumilus,  
Lactobacillus Leichmannii, y Pseudomonas Fragi, y los anti-  
genos utilizados con cada una de estas partículas indicado-  
ras fueron ASH, gamma globulina de caballo, e insulina hu-  
mana. Se realizaron ensayos del tipo de aglutinación en por-  
taobjetos.

10  
15  
Las células de B. subtilis y B. pumilus fueron ha-  
chas crecer de la misma manera que las de E. Coli del Ejem-  
plo II. Se hizo crecer L. leichmannii durante el mismo tiem-  
po a la misma temperatura de 37°C, en un caldo de cultivo  
compuesto de : 890 ml de agua, 100 ml de filtrado de jugo  
de tomate, 10 ml de "Bacto-Tween 80", 7,5 g de extracto de  
levadura, 7,5 g de peptona, 10 g de dextrosa y 2 g de fos-  
fato disódico. El caldo de cultivo tenía un pH de 6,8 y ha-  
bía sido tratado en autoclave durante 10 minutos a 121°C,  
bajo 1,05 kg/cm<sup>2</sup> manométricos para ser esterilizado.

20  
El P. fragi fue cultivado durante 4,5 horas a la tem-  
peratura ambiente (25°C) en un caldo de cultivo previamente  
esterilizado compuesto de : 1 litro de agua, 5 g de tripto-  
na 5 g de extracto de levadura, 1 g de dextrosa, y 1 g de  
fosfato disódico.

25  
30  
Entonces, las células recolectadas fueron formalini-  
zadas y se utilizó un volumen de 0,25 ml de cada una de las  
células compactadas, de acuerdo con el método de copulación  
del ejemplo II, suspendiendo tres tandas de cada una de es-  
tas células en 6 ml del tampón de fosfato de este ejemplo,  
y añadiendo entonces, a cada una de las porciones de las cé-  
lulas suspendidas, los siguientes antígenos disueltos en



5 ml de solución salina al 0,85 %: 3 mg de ASH, 40 mg de gamma globulina de caballo y 20 mg de insulina. Después de esto, se añadieron 20 ml de una dilución de 1 : 5 de la solución de BDB del Ejemplo II en tampón de fosfato, para llevar a cabo reacciones de copulación similares.

Cada uno de los 12 indicadores fué ensayado con sus respectivos anticuerpos y con muestras testigo de suero normal. Los sistemas indicadores de ASH y de gamma globulina de caballo fueron ensayados, respectivamente, con una dilución de 1 : 50 de anti-ASH de conejo y anti-(gamma globulina de caballo) de conejo, en solución salina, mientras que los sistemas indicadores de insulina fueron ensayados con un anti(suero de insulina) de cobaya no diluido, en solución salina. Las muestras testigo de comparación de cada una de los 12 ensayos se prepararon con una dilución de 1 : 10 de suero de conejo normal en solución salina. Los anticuerpos para cada uno de los antígenos aglutinaron cada uno de los 4 sistemas indicadores preparados con los antígenos individuales, y no se encontró aglutinación en las muestras testigo.

Mediante el presente invento se proporciona un amplio margen de indicadores inmunológicos del tipo de "células microbianas-agente de copulación". Estos pueden ser añadidos a sustancias antigénicas para proporcionar sistemas indicadores inmunológicos del tipo de "células microbianas-agente de copulación-sustancia antigénica" que se pueden utilizar para construir un amplio margen de ensayos y dispositivos para experimentación.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América el 28 de junio de 1.966 con:



el número 560.997 se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

- N O T A -

10

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España por VEINTE años son los siguientes:

15

1º.- Un método de preparar un indicador inmunológico para ser unido químicamente a sustancias antigénicas, caracterizado por las operaciones de poner en contacto células microbianas con moléculas de un agente de copulación, cada una de las cuales tiene al menos dos grupos reactivos no ligados, hacer que uno de dichos grupos reactivos forme un enlace químico covalente con dichas células microbianas, y mantener el otro de dichos grupos reactivos en un estado no ligado, con lo cual dicho indicador es capaz de reaccionar con sustancias antigénicas cuando es puesto en contacto con las mismas.

20

25

2º.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en que dichas células microbianas están seleccionadas entre el grupo de células bacterianas, fungicas, parasitológicas y de virus.

30



3º.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en que dichas células microbianas son de forma y tamaño uniformes, y tienen una dimensión máxima, en una dirección, de aproximadamente 0,2 a 10 micras.

5 4º.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en que dichas células microbianas son células tratadas con agente de conservación.

10 5º.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en que dichas células microbianas son células coloreadas y tratadas con agente de conservación.

15 6º.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicho agente de copulación está seleccionado entre el grupo que consiste en bisdiazobencidina, ácido bisdiazobencidino disulfónico, tetraazo-p-fenilenodiamina, difluorodinitrobenzeno, una carbodiimida, diisocianato de tolueno, cloruro cianúrico, dicloro-S-triazina y perclorato de N-t-butil-S-metil-isoxazolio.

20 7º.- Un método de preparar un indicador inmunológico para ser unido químicamente a sustancias antigénicas, que comprende las operaciones de formar una suspensión de células microbianas y un antígeno, poner en contacto dicha suspensión con un agente de copulación que tiene al menos dos grupos reactivos no ligados, uno de los cuales es susceptible de reaccionar con dichas células microbianas, y el otro de los cuales es susceptible de reaccionar con dicho antígeno, mantener dicho agente de copulación en contacto con dichas células microbianas y dicho antígeno durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la reacción entre los mismos, y separar después de  
25 esto el sistema indicador inmunológico resultante de dicha  
30



suspensión líquida.

8º.- Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en que dichas células microbianas son puestas en contacto en primer lugar con un agente de conservación, antes de dicha operación de puesta en contacto.

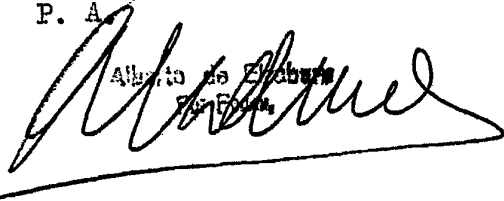
9º.- Un método de preparar un indicador inmunológico para ser unido químicamente a sustancias antigénicas.

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

Esta Memoria consta de cincuenta hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 14 MAY. 1968

P. A.

Alberto de Echeburu  


8-5-68/RTA.-