

Nº 345.586



345586

G O I N 33/16, 31/02, 31/00

PATENTE DE INVENCION

que por veinte años se solicita a favor de Baxter Laboratories
Inc., domiciliada en Morton Grove, Illinois (Estados Unidos),
de nacionalidad estadounidense, y que ha de recaer sobre

5

" PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UN REACTIVO PARA TEST
SEROLOGICO PARA EL DIAGNOSTICO DE LA SIFILIS "

=====

Memoria descriptiva

10

El registro de la patente de invención que se solicita
tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva en todo
el territorio nacional y sus posesiones de un procedimiento
de obtención de un reactivo para test serológico para el
diagnóstico de la sífiles, conforme se describe a continua-
ción.



La presente invención se refiere a un reactivo y a un test para el diagnóstico de la sífilis. Más particularmente, esta invención concierne al uso de partículas de latex en la preparación de un test serológico para la sífilis, en virtud de la cual, las partículas de latex son recubiertas con dos antígenos diferentes.

5

En la actualidad, existen numerosos tests serológicos que han sido desarrollados para la diagnosis de la infección sifilítica. Serologic Tests for Syphilis, Manual 1964, Public Service Publication número 411 (edición revisada 1964). Muchos de éstos tests diagnósticos son complicados y exigen mucho tiempo.

10

Una diagnosis serológica completa para la sífilis incluye ambos tests: el no-treponemal y el de anticuerpo treponemal. Los tests no-treponemales incluyen los test de fijación complementaria de Wassermann y Kolmer, así como los tests de microfloculación de Kahn, Kline, Eagle, Hinton, Mazzini y VDRL. Los tests para anticuerpo treponemal incluyen el test de fijación complementaria de proteína Reiter y otros procedimientos tales como los descritos, por ejemplo, por Deacon y Hunter, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., volumen 110, páginas 352-56 (1962).

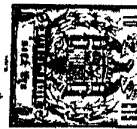
15

20

Recientemente, se desarrolló un test serológico para sífilis que emplea partículas de latex como un vehículo para el antígeno cardiolipin. La aglutinación de las partículas del latex revestidas de cardiolipin en ambos sueros VDRL y Kolmer-positivo demostró actividad sensitiva. Uyeda, Amer. J. Clin. Path., volumen 40, páginas 329-33 (1963) en el test se emplearon partículas de latex de poliestireno de 0,81 micrones de diámetro.

25

30



En otro reciente desarrollo de un test serológico para sífilis, se emplearon partículas de latex de poliestireno de 0,79 micrones de diámetro como vehículo para el antígeno de proteína Reiter. Este test de aglutinación para anticuerpo treponemal dió una comparación favorable respecto a los tests de fijación complementaria de proteína Reiter. Stevens, Amer. J. Clin. Path., volumen 43, página 490-93 (1965).

El reactivo obtenido de acuerdo con el procedimiento objeto de la presente invención permite la realización de un test para diagnóstico de la sífilis, en que se obtiene una diagnosis completa, es decir, tanto para los anticuerpos treponemales como para los no-treponemales, con una sola unidad reactiva de test, la cual es de operación rápida y simple. Dicho brevemente, el procedimiento objeto de la presente invención, consiste en el revestimiento de latex de poliestireno de un tamaño de partícula del orden de aproximadamente 0,10 a 0,35 micrones con una combinación de antígenos de cardiolipin y proteína Reiter.

El vehículo de latex de poliestireno, usado en la preparación del reactivo de diagnóstico es un polímero de alto peso molecular producido polimerizando el monómero de estireno en presencia de agua para formar retículos espaciales. Las partículas de polímero están, en la fase dispersa, en una suspensión acuosa y cargadas negativamente. El latex de poliestireno es estable ante repetidos ciclos de congelación y deshielo e infinitamente diluible en agua. Al parecer, el latex es auto-estirilizante.

Ejemplos adecuados de suspensiones de latex de poliestireno constituyen los materiales obtenibles de la Monsanto Chemical Company, bajo la marca comercial " Lytron 615" y de la



Koppers Company, Inc. bajo la marca comercial "Dylex K-31".

La suspensión del latex de poliestireno usada en la preparación del reactivo de diagnóstico de la presente invención consta del orden de aproximadamente 3% a 5% de sólidos y preferentemente alrededor de 4% de sólidos. Si el producto comercialmente disponible es más concentrado, puede ser diluido a los propósitos de esta invención, mediante medios convencionales, para dejarlo en la concentración apropiada, con agua destilada estéril.

Los dos antígenos usados de acuerdo con la presente invención para revestir las partículas del latex de poliestireno, han sido descritos en otro lugar. El cardiolipin es un fosfolípido obtenido del corazón del buey. Su preparación y composición se han descrito por Pangborn, Proc. Soc. Exc. Biol. and Med., volumen 48, páginas 484-86 (1941) y J. Biol. Chem., volumen 143, página 247-56 (1942), volumen 153, páginas 343-48 (1944), volumen 161, páginas 71-82 (1945) y volumen 168, páginas 351-61 (1947).

El antígeno cardiolipin consiste generalmente en una mezcla de cardiolipin, colesterol y lecitina. Una composición tal comprende:

- 0,03% cardiolipin
- 0,9% colesterol
- 0,21 ± 0,01% lecitina

Esta composición es conocida como antígeno VDRL y se ha descrito en los test serológicos para sífilis, manual 1944, como supra. Otros compuestos antígeno de cardiolipin son los descritos, por ejemplo, por Mazzini

345586



0,025% cardiolipin
0,2% lecitina
0,75% - 0,9% colesterol

y por Kolmer

5
0,03% cardiolipin
0,05% lecitina
0,3% colesterol

(Tests Serológicos para Sífilis, Manual 1964, supra.)

10
Se comprenderá que los compuestos de antígenos de cardiolipin descritos arriba y similares, para realizar tests de anticuerpos no-treponemales, quedan incluidos dentro del alcance de esta invención.

15
La proteina Reiter está preparada partiendo de un cultivo de treponemas Reiter mediante criolisis y precipitado de sulfato de amonio. Su preparación se ha descrito por D'Alessandro y Dardanone, Amer. J. Syph., volumen 27, páginas 137-50 (1953). En el test de fijación complementaria de proteina Reiter se usa la proteina Reiter. La sustancia reactiva real no ha sido definida. La dilución optima de antígeno para uso en el
20
test está determinada por la reactividad de las varias diluciones con sueros humanos sifiliticos conocidos. Bajo estas circunstancias, los miligramos de proteina presentes por mililitro de solución de antígeno, pueden variar en una amplia escala. La reactividad del antígeno no es directamente proporcional a la
25
cuantia total de proteina presente. En la práctica, la dilución óptima del antígeno comercialmente obtenido para uso en tests de fijación complementaria, tal como se señala en la etiqueta, es 1: 60. la proteina Reiter standarizada es comercialmente



obtenible de la Sylvana Chemical Company y de los Laboratorios Lederle. La concentración total de proteína en los antígenos estandarizados obtenidos de esas Compañías se determinó mediante espectrofotometría. El antígeno de Lederle, contenía 0,16350 mg de proteína por ml de solución no diluida, mientras que el de Sylvana contenía 1,0536 mg de proteína por ml de solución no diluida.

En la práctica de la presente invención, la suspensión de latex de poliestireno y los antígenos de cardiolipin y proteína Reiter son mezclados en una solución tampón acuosa. Normalmente, el pH de la solución tampón está por encima de aproximadamente 8,0 y preferiblemente es de aproximadamente 8,2. La solución tampón contiene también preferiblemente glicina y salina. El calentamiento del reactivo acelera el proceso de recubrimiento. La absorción del cardiolipin en la partícula de latex se efectúa más rápidamente calentándolo a 55-58°C durante varias horas. La proteína Reiter, sin embargo, es inestable a esta temperatura; por tanto el revestimiento con este antígeno se lleva a cabo a 37° (35-39°C).

La concentración de los antígenos en el reactivo de latex por cada mg de latex sólidos varia desde aproximadamente 0,007 mg a aproximadamente 0,187 mg de cardiolipin y desde aproximadamente 0,0005 mg a aproximadamente 0,03 mg de proteínas Reiter. Una forma preferida de realización de la invención prevé que el reactivo contenga por cada mg de latex sólidos alrededor de 0,1 mg de cardiolipin y de 0,004 mg de proteína Reiter. La proteína Reiter estandarizada, en su forma no diluida, está presente en una cantidad, al volumen, que oscila entre alrededor de 0,005 ml y alrededor de 0,05 ml por mg de latex sólidos. El método preferido para señalar la concentración de la proteína Reiter en el latex es el de relación de volumen a peso.

El reactivo de diagnóstico obtenido por el procedimiento descrito aquí proporciona las siguientes ventajas



en la práctica, en comparación con los tests de diagnóstico convencionales para la infección sifilitica.

1. Está listo para su uso y no requiere más preparación.
- 5 2. Es un reactivo estable y elimina la necesidad de preparar diariamente antígeno nuevo. Es estable hasta seis meses después de su preparación si se mantiene a una temperatura de almacenamiento de 2-10° C.
- 10 3. No hay necesidad de estandarizar el antígeno contra sueros positivo y negativo conocidos en laboratorios clínicos.
- 15 4. El uso de este reactivo no requiere equipo especial, tal como agujas, microscopios, pipetas especiales, etc. requeridos en los procedimientos de diagnóstico de sífilis convencionales.
- 20 5. Los resultados del test se obtienen rápidamente, es decir, dentro de aproximadamente dos minutos después de la inactivación inicial de calor del suero.

Los siguientes ejemplos ilustran aun mejor la invención descrita y reivindicada aquí, si bien la invención no está limitada a estos ejemplos específicos.

EJEMPLO I

25 Este ejemplo ilustra la preparación y estabilidad del reactivo de diagnóstico de la presente invención. En este ejemplo, una suspensión de latex de poliestireno conocida como "Lytron 615" obtenido de la Monsanto Chemical Company se emplea en forma estéril. La suspensión se centrifuga primeramente y
30 el grupo de partículas se vuelve a suspender en un volumen



igual de agua destilada estéril.

5 El antígeno de cardiolipin empleado en este ejemplo, es el antígeno VDRL obtenido de los laboratorios Lederle. Se informó que tenía una composición de 0,03 % de cardiolipin, 0,9% de colesterol y 0,21 ± 0,01 % de lecitina.

La proteína Reiter de este ejemplo se obtuvo de Laboratorio Lederle, La dilución a usar en el test de fijación complementaria fue 1 : 60.

10 Para el uso de los materiales antedichos se preparan dos soluciones tampón acuosas como sigue:

TAMPON A-

0,05 M glicina

0,85% NaCl

Ajustado a pH 8,2 con NaOH

0,00005 M EDTA

15 (ácido etilenodiaminotetraacético)

TAMPON B-

0,71 M cloruro de colina adicionado

al tampón A

No se precisa más ajuste en pH

20 El anterior concentrado de cloruro de colina puede ser variado entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,85 M.

El reactivo del diagnóstico de este ejemplo se prepara como sigue:

25 1. Precipitense 150 ml de antígeno cardiolipin con 300 ml de tampón A. La proporción de tampón A respecto al antígeno puede variar desde 0,5 a un número infinito de volúmenes de tampón A por un volumen de antígeno. La importancia de esta fase consiste en separar el antígeno de la solución alcohólica en que se obtiene comercialmente.

2. Centrifúguese a 13.000 x gravedad durante 20 minu-



tos. Viértase fuera lo que sobrenade.

3. Agréguese 10 a 20 ml de tampón A o lo suficiente para volver a suspender el precipitado completamente.

5 4. Agréguese 10 ml de latex, que habrán sido previamente centrifugados, y vueltos a poner en suspensión en un volumen igual de agua.

5. Complétense los 200 ml con tampón A

6. Caliéntense en un baño de agua a 56°C durante cuatro horas o manténgase a 5°C durante 12 a 24 horas.

10 7. Si se ha calentado, enfriése a la temperatura ambiente después de retirado del baño de agua y refrigérese durante 48 horas (2-10°C).

8. Si se ha mantenido a 5°C, manténgase aún durante un periodo adicional de 48 horas.

15 9. Hagase llegar a la temperatura ambiente.

10. Añadanse 2 ml de proteína Reiter y agítase de 16 a 24 horas a 37°C.

11. Refrigérese durante 48 horas (2-10°C).

20 12. Centrifúguense a 13.000 x gravedad durante 30 a 45 minutos y vélvase a poner en suspensión en volumen igual (200 ml) en tampón B.

13. Refrigérese 48 horas antes de usarse (2-10°C).

25 14. Si la sensibilidad del reactivo es baja puede agregarse proteína Reiter adicional siguiendo las instrucciones 10 a 13. Esto puede repetirse tan a menudo como sea necesario hasta que el reactivo alcance la sensibilidad óptima.

En el ejemplo anterior, las concentraciones de los antígenos están calculadas como sigue:

30 Cardiolipin. - Con base en la composición antedicha del cardiolipin y en el uso de latex que tenga 4% de sólidos:

0,03 % cardiolipin - 0,03 gm/100 ml de solución



o 0,3 mg/ml

0,9 % colesterol - 0,9 gm/100 ml de solución

o 9,0 mg/ml

0,21 % lecitina - 0,21 gm/100 ml de solución

5

o 2,1 mg/ml

En el anterior procedimiento se usan 15 ml de antígeno cardiolipin por cada ml de partículas de latex. Por tanto, el número de miligramos por ml de antígeno cardiolipin usado por cada ml de latex deberá multiplicarse por 15.

10

Cardiolipin - 0,3 mg/ml x 15 = 4,5 mg/ml de latex

Colesterol - 9,0 mg/ml x 15 = 135,0 mg/ml de latex

Lecitina - 2,1 mg/ml x 15 = 31,5 mg/ml de latex

Concentración de latex - 4% de sólidos o 4,0 gm/100 ml o 40 mg/ml

15

Por tanto, la concentración de cardiolipin por mg de latex es:

Cardiolipin - 4,5 mg/ml + 40 mg/ml = 0,112 mg/mg latex

Colesterol - 135,0 mg/ml + 40 mg/ml = 3,375 mg/mg latex

Lecitina - 31,5 mg/ml + 40 mg/ml = 0,7875 mg/mg latex

En el ejemplo de arriba, 15 ml de antígeno Mazzini

20

(preparado por ml de latex de stock) y 5 ml de antígeno Kolmer (preparado por ml de latex de stock) pueden ser sustituidos por el antígeno VDRL para proporcionar un reactivo de diagnóstico para sífilis sustancialmente equivalente.

25

Proteína Reiter. En la preparación del anterior reactivo de diagnóstico la concentración óptima del antígeno de proteína Reiter no diluido, portando el título en la etiqueta, resultó ser un ml por 100 ml de reactivo o 1 ml por 5 ml de latex.

30

El reactivo del diagnóstico de este ejemplo se comprobó que permanecía estable después de haber sido almace-



nado durante seis meses a una temperatura de almacenamiento de 10° C.

EJEMPLO 2

5 Este ejemplo ilustra la forma conveniente de usar el reactivo de diagnóstico objeto de la invención y la confianza que inspira en la diagnosis de la sífilis. Se usa el siguiente procedimiento:

1. Caliéntese el suero del test a 56° C durante 30 minutos
- 10 2. Retírese del refrigerador el reactivo del diagnóstico tal como se ha preparado en el ejemplo 1 y caliéntese a la temperatura ambiente dejándolo al aire.
3. Usando una pipeta capilar, coloquense dos gotas del suero calentado en el centro de un área circular sobre un porta-objetos de cristal limpio.
- 15 4. Agreguese una gota del reactivo de diagnóstico y mézclese bien con un palillo aplicador de madera.
5. Ladéese durante 2-4 minutos o hágase girar durante 2 minutos en un girador similar al tipo aprobado para el test VDRL de microfloculación por porta-objetos.
- 20 6. Léase contra un fondo negro, usando una luz fluorescente u otra luz blanca a un ángulo por encima del porta-objetos. La aglutinación de las partículas de latex se compara con la encontrada en sueros sifiliticos positivos y negativos humanos conocidos.
- 25

Negativo - no aglutinación o aglutinación no más fuerte que la observada en el control negativo

Positivo - pequeños o grandes grupos o agregaciones de partículas de latex con un fondo nuboso o claro.



5 Los tests se practicaron en dos laboratorios cooperantes, independientes, sobre 565 sueros desconocidos. Los resultados de estos tests, comparando los resultados de tests VDRL de microfloculación con los del reactivo de diagnóstico de la presente invención aparecen en la tabla I que se acompaña.

10 En esta tabla el término "Latex STS" (pantalla de test para sífilis) se refiere a los tests que emplean el reactivo de diagnóstico de la presente invención. Los términos "R", "WR" y "NR" son las designaciones oficiales para los resultados del test VDRL (Test serológicos para sífilis, manual 1964, supra), los cuales hacen referencia respectivamente a resultados reactivos, débilmente reactivos y no-reactivos obtenidos con este test.

15 Los 514 sueros arrojando tests negativos y no-reactivos en el primer laboratorio cooperante no fueron repetidos por el segundo laboratorio cooperante. Los restantes 51 se volvieron a someter al test , excepto uno que contenía infuciente suero para repetir ambos tests.

20 Los términos "correlación 100%"y " no-correlación" se refieren a la comparación de los resultados del test VDRL con los de Latex STS. No se refieren a la correlación de resultados entre los dos laboratorios. La correlación entre los resultados del test VDRL y los resultados de Latex STS, en este ejemplo, es aproximadamente $93\% \left(\frac{529}{565} \right)$.

25



Correlación 100%			Correlación 100%		
Primer Laboratorio cooperante			Segundo Laboratorio cooperante		
<u>Latex STS</u>	<u>VDRL</u>	<u>#</u>	<u>Latex STS</u>	<u>VDRL</u>	<u>#</u>
Pos.	R	5	Pos.	R	9
Pos.	WR	10	Pos.	WR	7
Neg.	NR	514	Neg.	NR	15

No Correlación			No Correlación		
Primer Laboratorio cooperante			Segundo Laboratorio cooperante		
<u>Latex STS</u>	<u>VDRL</u>	<u>#</u>	<u>Latex STS</u>	<u>VDRL</u>	<u>#</u>
Neg.	R	0	Neg.	R	0
Neg.	WR	17	Neg.	WR	2
Pos.	NR	19	Pos.*	NR	17

* No hubo test por insuficientes sueros

EJEMPLO III

Este ejemplo ilustra una presentación preferida del producto obtenido según la presente invención, aunque se comprenderá que el reactivo puede estar presentado de otras maneras, por ejemplo con menos del total de los materiales indicados, o en combinación con otros materiales, o en otras proporciones.

El reactivo de diagnóstico está presentado en forma de un estuche. Este estuche incluye 5 ml del reactivo de diagnóstico obtenido



según la presente invención, 1 ml del suero de control positivo, 1 ml del suero de control negativo, 100 pipetas capilares para suministro de muestras de test y un porta-objetos de cristal dividido, conteniendo 9 anillos para la realización del test.

5 Como se comprenderá fácilmente para los expertos en la técnica, pueden concebirse otros ejemplos de preparación del reactivo de diagnóstico aquí definido y el test para sífilis puede concebirse mediante varias modificaciones, variaciones y adaptaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención después de leer la precedente memoria y las reivindicaciones que se agregan al final. Todas estas modificaciones y adaptaciones quedan englobadas en el alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones finales.

10

15 NOTA DE REIVINDICACIONES

Se reivindica como propio y nuevo a favor de la firma Baxter Laboratories, domiciliada en Morton Grove (EE.UU.), lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

20 PRIMERA.- Procedimiento de obtención de un reactivo para test serológico para diagnóstico de la sífilis, capaz de procurar una diagnosis completa con una sola unidad reactiva de test, caracterizado en que latex de poliestireno de un tamaño de partícula de aproximadamente entre 0,1 y 0,35 micrones, es revestido con una combinación de antígenos de cardiolipin y proteína Reiter mediante mezcla en una solución tampón acuosa,

25 preferentemente acelerada por calentamiento.

30 SEGUNDA.- Procedimiento de obtención de un reactivo para diagnóstico de la sífilis según la reivindicación precedente, caracterizado en que en la fase de recubrimiento del latex



con los antigenos de cardiolipin puede mantenerse la mezcla a una temperatura de alrededor de 5° C durante 12 a 24 horas y un periodo adicional de 48 horas antes de llevarla a la temperatura ambiente.

- 5 TERCERA.- Procedimiento de obtención de un reactivo para diagnóstico de la sífilis, caracterizado en que la fase de recubrimiento del latex con los antigenos de cardiolipin puede acelerarse mediante calentamiento a una temperatura de 55° C a 58° C durante unas horas.
- 10 CUARTA.- Procedimiento de obtención de un reactivo para diagnóstico de la sífilis según la reivindicación primera caracterizado en que en la fase de recubrimiento del latex con la proteina Reiter se lleva a cabo manteniendo la mezcla a una temperatura entre 35° C y 39° C.
- 15 QUINTA.- Procedimiento de obtención de un reactivo para diagnóstico de la sífilis según la reivindicación primera, caracterizado en que en el revestimiento de cardiolipin supone una cuantia, al peso , de aproximadamente entre 0,007 mg y 0,187 mg por miligramo de latex.
- 20 SEXTA.- Procedimiento de obtención de un reactivo para diagnóstico de la sífilis, según la reivindicación primera, caracterizado en que en el revestimiento, la proteina Reiter estandarizada, en su forma no diluida, supone una cuantia, al volumen, de aproximadamente entre 0,005 ml y 0,05 ml por mg de latex.
- 25 SEPTIMA.- Procedimiento de obtención de un reactivo para diagnóstico de la sífilis, según la reivindicación primera, caracterizado en que en el revestimiento el cardiolipin supone una cuantia, al peso, de aproximadamente entre 0,007 mg y 0,187 mg por mg de latex y la proteina Reiter estandarizada, en su forma no diluida, su-



supone una cuantía, al volumen, de aproximadamente 0,005 ml y 0,05 ml por mg de latex.

OCTAVA.- " PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UN REACTIVO PARA TEST SEROLOGICO PARA EL DIAGNOSTICO DE LA SIFILIS "

5

Tal y como se deja descrito en la memoria precedente que consta de dieciseis hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

Madrid, 29 Septiembre 1967

P.A. de Baxter Laboratories

10

Victor Gil Vega