



382558

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I.P.C.
CLASE <u>G 01</u>
SUBCLASE <u>N</u>

PATENTE DE INVENCION

que por veinte años se solicita a favor de Baxter Laboratories Inc, de nacionalidad estadounidense, con domicilio en MORTON GROVE, ILLINOIS (Estados Unidos), y que ha de recaer sobre " METODO PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS FIJADORES DE COMPLEMENTO EN FLUIDOS BIOLOGICOS ".

5

Memoria descriptiva

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 método para la determinación de anticuerpos fijadores de complemento en fluidos biológicos, conforme se describe a continuación .

10

382558



La presente invención se refiere a un método para la determinación de anticuerpos en fluidos biológicos y, mas particularmente, a un método de difusión para la determinación cuantitativa o semi-cuantitativa de anticuerpos fijadores de complemento en suero sanguíneo.

5

Los anticuerpos son sustancias complejas de proteína presentes en el suero sanguíneo, algunas de las cuales se conocen para proteger contra agentes infecciosos (bacterias o virus) o para neutralizar toxinas. Estas sustancias desempeñan un papel importante en la inmunización contra microbios y toxinas. Las mismas causan aglomeración e destrucción de células, o precipitación de proteínas en lo que se denomina, generalmente, una reacción anticuerpo-antígeno.

10

Se han desarrollado varias técnicas, hasta ahora, para la determinación de los anticuerpos o para la medición de las reacciones anticuerpo-antígeno. Como en otras proteínas, la presencia de anticuerpos puede demostrarse por métodos convencionales de precipitación fraccional, electroforesis, ultracentrifugación y otros, tales como métodos físico-químicos o analíticos.

15

Un procedimiento que se ha encontrado ser un instrumento analítico y diagnóstico particularmente útil para la determinación de anticuerpos o antígenos es la técnica conocida como "inmunodifusión". La inmunodifusión implica una reacción, por ejemplo entre un antígeno y un anti-cuerpo en medios de gel semi-sólido, generalmente un gel de agar. Ambos reactantes son inicialmente solubles en el medio, pero el producto de la reacción subsiguiente o complejo de la reacción antígeno-anticuerpo es insoluble y da por resultado la formación de un arco de precipitina visible que puede ser observado a ojo desnudo o mediante fotografía. El método de difusión de gel de agar, para el estudio de las reacciones

20

25

30

382558



de precipitacina ha venido a ser conocido como la técnica de Ouchterlony debido a la temprana e intensiva obra, en este campo escrita por Orjan Ouchterlony titulada "Handbook of Immuno-diffusion and Immunoelctrophoresis", publicada por Ann Arbor Science Publishers, Inc. de Ann Arbor, Michigan (1.968).

Una especial adaptación de la inmunodifusión, conocida como "inmunolectroforesis" emplea la técnica combinada de separación de mezclas de antígenos por electroforesis de gel de agar y subsiguientes reacciones de anticuerpo-antígeno que resulta en la formación de arcos Ouchterlony o de precipitina.

Otra adaptación de la inmunodifusión, conocida como "inmunodifusión radial", emplea un sistema de gel de agar que contiene el anticuerpo en el gel de agar y, el antígeno en el suero de ensayo se difunde radialmente desde un depósito circular o pozo, para formar una zona radial de precipitina en el gel de agar.

Las antedichas técnicas generales de inmunodifusión están resumidas por Lou y Shanbrom, J. Am. Med. Ass'n, Vol.200, páginas 161 y 323 (1.966).

En el estudio de ciertas reacciones antígeno-anticuerpo se ha hallado que para completar la reacción se requiere la ayuda de un agente especial, presente en los sueros normales, conocido como complemento. En estas reacciones serológicas se han distinguido dos etapas. La primera etapa es la unión específica entre los anticuerpos y el substrato, que es seguida, entonces, por una segunda etapa que implica cambios visibles tales como la floculación o lisis. Así, es conocido que, después de la fijación de lisinas en las células, es necesaria la adición de complemento para dar lugar a la disolución.

La característica de complemento que ha de ser unida median

382558



5 te los agregados formados mediante la inter-acción de antígenos y anticuerpos es la base para un test serológico comunmente usado, denominada reacción de complemento-fijación. En este test, el antígeno y anticuerpo a ensayar se mezclan con una fuente de complemento y, después de incubación, se agregan suero immune hemolítico y las correspondientes células rojas. Si tiene lugar una reacción inmunológica en la primera etapa, se fija el complemento y se retira de la solución y se previene la hemolisis, completamente o en parte, según la intensidad de la reacción.

10 Técnicas de inmunodifusión como las anteriormente descritas se han aplicado recientemente a estudios sobre hemolisis serológica, particularmente para estudios sobre el test de complemento-fijación. Así, Milgrom y al., Vox Sang., Vol, 8, páginas 537-48 (1.963) y J.Immunol., Vol. 96, páginas 415-26 (1.966), han descrito procedimientos de difusión de gel de agar para estudios sobre lisis de células sanguíneas rojas de ovejas, inducidas por hemolisina de anti-oveja, de conejo, y complemento de cobayo. En procedimientos de difusión individuales, se estudiaron zonas hemolíticas que estaban formadas por difusión de complemento dentro de agar conteniendo células sanguíneas rojas de oveja y hemolisina, así como zonas hemolíticas formadas por difusión de hemolisina en agar conteniendo células sanguíneas rojas de oveja y complemento. En procedimientos de difusión doble, el complemento y la hemolisina se dejaron difundir, una contra otra, en agar
20 conteniendo solamente eritrocitos de oveja. Estos procedimientos de difusión se aplicaron particularmente para el estudio de anticuerpos hemolíticos γG y γM .

25 Es una finalidad de la presente invención proporcionar un nuevo y mejorado método para la determinación de anticuerpos fijadores de complemento en fluidos biológicos.
30

382558



Otra finalidad de esta invención es proporcionar un método de difusión individual para la determinación cuantitativa o semicuantitativa de anticuerpos fijadores de complemento en suero sanguíneo.

5 Es una finalidad más de esta invención proporcionar un método rápido y conveniente para detectar y determinar la cantidad de anticuerpos fijadores de complemento en el suero de un paciente, como un adjunto útil en la diagnosis de enfermedades que se sabe producen anticuerpos fijadores de complemento, por ejemplo, varias
10 infecciones microbianas, virales, bacterianas, rickettsianas, protozónicas, fungosas y helmínticas.

Otras finalidades y ventajas resultarán aparentes a las personas entendidas en esta técnica después de la lectura de esta memoria.

De acuerdo con la presente invención, predeterminadas cantidades de complemento y un antígeno fijador de complemento se
15 mezclan con un fluido biológico conteniendo anticuerpos en predeterminadas proporciones y la mezcla se hace reaccionar con una cantidad conocida de eritrocitos sensibilizados a la hemolisina en un medio de gel semi-sólido durante un predeterminado periodo de
20 tiempo.

En este proceso, si no se fija complemento (test negativo) aparece una clara, visible zona de difusión radial de lisis, mientras que si se fija complemento y antígeno al anticuerpo (test
positivo) no tiene lugar ninguna lisis. En un test positivo, el
25 diámetro de la zona de difusión es inversamente proporcional al grado o índice de anticuerpos fijadores de complemento.

En un método preferido de la invención, los eritrocitos sensibilizados a la hemolisina están homogéneamente dispersos en un medio de gel semi-sólido sobre un plato y la mezcla de comple-

382558



5

mento, antígeno fijador de complemento y fluido biológico conteniendo anticuerpos, se introduce en el medio de gel semi-sólido a través de pozos abiertos o agujeros cilíndricos perforados, o formados de otro modo, en el gel. En este proceso, la zona de difusión o lisis se formará en la cara intermedia entre el gel y la muestra de fluido introducido a través de los pozos.

10

Preferentemente, se agrega una mezcla de antígeno fijador de complemento y un exceso de complemento a la muestra desconocida de suero sanguíneo, u otro fluido biológico a determinar, para anticuerpos fijadores de complemento y, la mezcla resultante, se agrega a los pozos abiertos por medios de una pipeta capilar o dispositivo similar. El plato entonces, se incuba a una temperatura de entre aproximadamente 0° y aproximadamente 50°C durante un periodo de unos 30 minutos a unas 48 horas y preferentemente, a aproximadamente 30° - 40°C durante aproximadamente 2-6 horas. Durante esta incubación, aparecerá una lisis o zona de difusión clara, radial, en un test negativo.

15

20

Las cantidades y proporciones de antígeno, complemento y muestra desconocida, usados en el método de esta invención, pueden variar ampliamente en tanto que estén predeterminadas y pueden ser comparados con muestras conocidas o de control. En un ejemplo ilustrativo, se obtienen excelentes resultados cuando un volumen de antígeno, un volumen de complemento que ha sido diluido 1:5 y un volumen de suero sanguíneo desconocido se incuban a aproximadamente 0°-10°C, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 18 horas.

25

30

En la preparación del medio de gel, puede usarse cualquier medio convencional para formación de gel, por ejemplo, gelatina, pectina, gel silíceo, almidón, polisacáridos de algas marinas como agar, algina y carragenina, agentes sintéticos poliméricos

382558



5 formadores de gel tales como la poliacrilamida de eslabón cruzado, descrita en la patente estadounidense 3.046,201, las celulosas modificadas, descritas en la patente estadounidense 3.360.440 y materiales análogos. Preferiblemente el agente formador de gel tiene las propiedades físicas que caracterizan el agar-agar en cuanto éste se dispersa rápidamente en agua y es capaz de formar un hidrogel esencialmente claro, de suficiente rigidez, de suerte que el receptáculo o plato conteniendo el gel pueda ser invertido sin peligro de que el gel se caiga.

10 Agar es el agente formador de gel preferido, empleado en el medio de gel de la presente invención. Este agente formador de gel se usa, generalmente, a una concentración de entre aproximadamente 0, 1% y aproximadamente 5% al peso del medio de gel y, preferentemente, a una concentración de aproximadamente 1,5% al peso del medio de gel.

15 El medio de gel se prepara, convenientemente, disolviendo el agente formador del gel en agua caliente, agregando cantidades predeterminadas de eritrocitos sensibilizados a la hemolisina, mezclándolos concienzudamente y vertiéndolos en un receptáculo plano de lados (denominado aquí también plato) en una cantidad apropiada para el tamaño del plato. Los eritrocitos sensibilizados a la hemolisina se usan, generalmente, a una concentración de entre aproximadamente 0, 05% y aproximadamente 5% al peso del medio de gel, y preferentemente a una concentración de 0,5% al peso, aproximadamente, del medio de gel. Preferentemente, para preparar el medio de gel se usan iguales volúmenes de soluciones del agente formador de gel y de los eritrocitos sensibilizados a la hemolisina. La mezcla del agente formador de gel y de eritrocitos sensibilizados a la hemolisina se la deja que se convierta en gel y se practican perforaciones de pozos o agujeros cilíndri-

382558



cos de aproximadamente 1 a 10 mm de diámetro, punzonando el gel, o de otra manera.

5 El método de esta invención puede usarse para la determinación de anticuerpos que reaccionarán con antígenos en una reacción de complemento-fijación. De este modo, puede usarse para determinar los anticuerpos en varios antígenos bacterianos, fungosos, virales, parasíticos, rickettsianos. Un ejemplo de un antígeno fijador de complemento adecuado es el antígeno Kolmer descrito por Kolmer y al., J. Vener. Dis. Inform., Vol. 29, páginas 166-72 (1.948). Otros 10 antígenos fijadores de complemento que pueden servir de ilustración son los antígenos de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, tifus epidémico, virus de la parotiditis y de la coccidioidomicosis.

15 El complemento usado en esta invención puede obtenerse de cualquier fuente bien conocida de complemento. Por ejemplo, puede usarse un suero completo liofilizado de cobayo, obtenible comercialmente reconstituido a su volumen original. Preferiblemente, el suero reconstituido se diluye a una proporción de 1:5 antes de usarse.

20 También puede prepararse convenientemente un complemento adecuado recogiendo sangre completa de cobayo y permitiéndola que coagule. Se retiran las células sanguíneas rojas por centrifugación y el suero retenido se congela y se seca y, luego, se reconstituye antes de usarse.

25 Preferiblemente, el complemento seco se reconstituye con solución salina Kolmer, que se puede preparar disolviendo 8,5 g. de NaCl, 0,082 g. de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y 0,040 g. de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ en un litro de agua destilada.

Preferentemente, se agrega una pequeña cantidad de preservativo, por ejemplo, aproximadamente 0,01% de azida sódica al complemento antes del secado.

30 Para usarse en la presente invención como fuente de comple-

382558



mento puede emplearse también de origen humano, de conejo y de otras especies de animales.

5

Los eritrocitos sensibilizados a la hemolisina, usados en esta invención, son preferentemente células sanguíneas rojas de oveja sensibilizadas a la hemolisina. Estas últimas células se ponen en suspensión en solución salina Kolmer a una concentración de aproximadamente 1% a 5% y preferentemente a unos 2% en volumen, y entonces se sensibilizan con hemolisina de célula de oveja.

10

15

Las células rojas de oveja pueden sensibilizarse a la hemolisina como sigue: se diluye hemolisina de célula de oveja en aproximadamente 10 a aproximadamente 100 y, preferentemente, alrededor de 19 volúmenes de solución salina Kolmer. A un volumen de ésta disolución de hemolisina se agrega aproximadamente un volumen de células sanguíneas rojas de oveja, preferentemente en una suspensión al 2% como arriba se ha descrito. La hemolisina de célula de oveja y las células sanguíneas rojas de oveja, se mezclan a aproximadamente 0°-30°C y, preferentemente, a unos 25°C, durante 10 minutos, con lo cual las células rojas de oveja resultan sensibilizadas a la hemolisina. Suero de conejo o suero de otra especie animal que posea anticuerpos a las células sanguíneas rojas de oveja, pueden usarse como hemolisina de célula de oveja.

20

25

30

El plato de gel conteniendo eritrocitos sensibilizados a la hemolisina, puede cubrirse con una membrana protectora, envasarse mediante varios medios y, así, hacerlos convenientemente disponibles para subsiguiente uso en la determinación de actividad de anticuerpos fijadores de complemento en hospitales, laboratorios y otras entidades y personas que tengan necesidad de una determinación simplificada, pero precisa, de actividad fijadora de complemento en muestras de plasma sanguíneo. El envasado de estos platos puede ser por ejemplo, bolsas o sacos de película de plástico o

382558



de hoja de metal y análogos., preferentemente esterilizados y sellados para prevenir la introducción de aire, humedad, suciedad y otros materiales de contaminación. Se puede elaborar láminas adecuadas, por ejemplo, de aluminio y metales análogos; pueden elaborarse películas de plástico adecuadas de cloruro de vinilo y copolímeros de cloruro de vinilidieno, cloruro de polivinilo, alcohol polivinílico, polietileno, polipropileno, poliestireno, policarbonatos, poliamidas, acetato y propionato de celulosa, triacetato de celulosa, buritato acetato de celulosa, etil celulosa, fluorocarbonos, plásticos acrílicos, tales como acrilatos y metacrilatos, y poliésteres, tales como, por ejemplo, poliésteres formados mediante reacciones de condensación entre etileno glicol y ácido tereftálico.

Los platos de gel que contienen los eritrocitos sensibilizados a la hemolisina pueden envasarse en combinación con los antígenos fijadores de complemento, complemento y muestras de control, así como con los tubos capilares y otros componentes para la realización de ensayos completos de fijación de complemento.

Los siguientes ejemplos ilustrarán más completamente la invención, si bien esta última no se limita a estos ejemplos específicos. Todas las partes y porcentajes en ellos están a base de peso de no especificarse de otra manera.

EJEMPLO 1

Se ponen en suspensión eritrocitos sensibilizados a la hemolisina en un medio de gel semi-sólido del siguiente modo:

Se diluye hemolisina de célula de oveja en proporción de 1:20 en solución salina K_omer y, entonces, se mezcla con un volumen igual de células rojas de oveja. Esta mezcla se mezcla entonces con una parte igual en volumen de una solución acuosa ca



lentada de 3,0% de Agar Difco Noble. La mezcla calentada se vierte, entonces, en un plato de aproximadamente de 75 x 25 x 6 mm de profundidad y se deja convertir en gel. Entonces, se punzan en el gel 6 agujeros de 2 milímetros de diámetro cada uno, espaciados equidistantemente.

5

El plato de ensayo, preparado como arriba se indica, se emplea entonces para la determinación de anticuerpos fijadores de complemento a antígeno Kolmer como sigue: primeramente se mezcla una parte en volumen de antígeno Kolmer con igual volumen de complemento y luego con un volumen igual de muestra de suero sanguíneo, en un tubo de ensayo y se mantiene a 50°C durante una hora. El complemento es un complemento de cobayo reconstituido, diluido en proporción de 1:5 con solución salina de Kolmer. La mezcla se agrega, entonces, a uno de los pozos en el plato y se incuba a 37°C durante 4 horas. Al final del periodo de incubación aparece una zona de lisis clara, de visible difusión radial en un test negativo en el cual no se ha fijado complemento, mientras que en un test positivo, en el cual se ha fijado complemento y antígeno Kolmer al anticuerpo en la muestra de suero sanguíneo, no aparece lisis o es sustancialmente menor.

10

15

20

Para proporcionar una determinación cuantitativa o semi-cuantitativa de los anticuerpos fijadores de complemento, se comparan tres diferentes disoluciones de una muestra de suero sanguíneo desconocido con tres disoluciones similares de una muestra conocida o de control. En este procedimiento, los diámetros de anillo de las muestras de control pueden compararse con los diámetros de anillo de las muestras desconocidas y así estimar el grado o índice de los anticuerpos fijadores de complemento. La zona de lisis es, de modo sustancial, inversamente proporcional al grado de complemento fijado por la reacción.

25

30

382558



EJEMPLO 2

Se repite el ejemplo 1 excepto en que el antígeno de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas se sustituye por el antígeno Kolmer en dicho ejemplo, para determinar el grado de anticuerpo fijador de complemento de la muestra de suero sanguíneo contra el antígeno del test.

5

EJEMPLO 3

Se repite el ejemplo 1 excepto en que el antígeno del tifus epidémico se sustituye por el antígeno Kolmer en dicho ejemplo para determinar el grado del anticuerpo fijador de complemento de la muestra de suero sanguíneo contra el antígeno del test.

10

EJEMPLO 4

Se repite el ejemplo 1 excepto en que el antígeno del virus de la parotiditis se sustituye por el antígeno Kolmer en dicho ejemplo, para determinar el grado del anticuerpo fijador de complemento de la muestra de suero sanguíneo contra el antígeno del test.

15

EJEMPLO 5

Se repite el ejemplo 1 excepto en que el antígeno fungoso de coccidioidomycosis por el antígeno Kolmer en dicho ejemplo, para determinar el grado de anticuerpo fijador de complemento de la muestra de suero sanguíneo contra el antígeno del test.

20

Varios otros ejemplos pueden concebirse por persona experta en la técnica, después de leer lo precedente y las reivindicaciones finales, sin por ello desbordar el espíritu y alcance de la presente invención. Así, otros antígenos fijadores de complemento deben ser sustituidos por los antígenos de los ejemplos precedentes para la determinación de los correspondientes anticuerpos fijadores de complemento. Pueden usarse, en lugar de las disoluciones específicas descritas en los ejemplos que anteceden con

25

30



5 sustancialmente, resultados equivalentes, otras disoluciones de antígenos, complementos, eritrocitos sensibilizados a la hemolisina y agente formador de gel. Todos tales otros ejemplos quedan incluidos en el alcance de esta invención, como se define en las reivindicaciones finales.

Los materiales, forma, tamaño y disposición de los elementos serán susceptibles de variación siempre que ello no suponga una alteración de la esencialidad del invento.

10 Los términos en que se ha redactado esta memoria deberán ser siempre tomados en sentido amplio no limitativo.

NOTA DE REIVINDICACIONES

15 Se reivindica como de propia y nueva invención a favor de Baxter Laboratories Inc., con domicilio en MORTON GROVE, ILLINOIS (Estados Unidos), lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

20 PRIMERA.- Método para la determinación de anticuerpos fijadores de complemento en fluidos biológicos, caracterizado en que comprende la mezcla de cantidades predeterminadas de complemento y antígenos fijadores de complemento, con un fluido biológico que contiene anticuerpos en predeterminadas proporciones y en que, entonces, se hace reaccionar la mezcla con una cantidad conocida de eritrocitos sensibilizados a la hemolisina en un medio de gel semi-sólido durante un periodo de tiempo predeterminado.

25 SEGUNDA.- Método según la reivindicación primera, caracterizado en que el medio de gel contiene eritrocitos sensibilizados a la hemolisina en un plato y en el cual se permite que la mezcla de complemento, antígeno fijador de complemento y fluido biológico conteniendo anticuerpos, entren en contacto con dichos eritrocitos sensibilizados a la hemolisina para reaccionar con ellos, por difusión, desde un pozo o agujero punzonado a través de la

30

Ref.

382558



superficie de gel.

TERCERA.- Método según la reivindicación segunda, caracterizado en que el medio de gel contiene entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 5% al peso de agar.

5

CUARTA.- Método según la reivindicación segunda, caracterizado en que el medio de gel, contiene entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 5% al peso de eritrocitos sensibilizados a la hemolisina.

10

QUINTA.- Método según la reivindicación segunda, caracterizado en que el complemento, antígeno fijador de complemento y fluido biológico conteniendo anticuerpos se mezclan en aproximadamente iguales proporciones en volumen.

15

SEXTA.- Método según la reivindicación segunda, caracterizado en que el medio de gel contiene entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 5% al peso de agar y entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 5% al peso de eritrocitos sensibilizados a la hemolisina y en que el complemento, antígeno fijador de complemento y fluido biológico conteniendo anticuerpos se mezclan en, aproximadamente, iguales proporciones en volumen.

20

SEPTIMA.- Método según la reivindicación sexta, caracterizado en que los anticuerpos fijadores de complemento se determinan en suero sanguíneo.

25

OCTAVA.- Método según las reivindicaciones precedentes caracterizado en que se emplea un plato de gel de agar para la determinación cuantitativa de anticuerpos fijadores de complemento comprendiendo un plato y un medio de gel de agar que contiene una cantidad predeterminada de eritrocitos sensibilizados a la hemolisina.

30

NOVENA.- Método según la reivindicación octava caracterizado en que se emplea un plato de gel de agar cuyo medio de gel contiene entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 5% al peso de agar

psj

382558



y entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 5% al peso de eritrocitos sensibilizados a la hemolisina.

DECIMA.- METODO PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS FIJADORES DE COMPLEMENTO EN FLUIDOS BIOLOGICOS.

5

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

Madrid, 7 de Agosto de 1.970

P.A. de Baxter Laboratories Inc.

Victor Gil Vega.

P.P.