

385489



Cl. C. A61B

P A T E N T E

D E

I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO DE PRUEBA DE DIAGNOSTICO PARA LA INDICACION SELECTIVA DE LA HEPATITIS", a favor de DON JAMES F. McCULLER, de nacionalidad estadounidense, domiciliado en "451 Fulton Avenue", HEMPSTEAD, N. Y. - Estados Unidos de América.

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un procedimiento de prueba de diagnóstico para la indicación selectiva de la hepatitis, (hepatitis infecciosa o de suero), que comprende el fraccionamiento criogénico de suero de sangre humana seguido de una separación cuidadosa de la fracción del fondo o crio-precipitado, y una vez separada dicha fracción en proceso se añade a la misma un reactivo selecto de glicina-salina que tiene una concentración y un pH particulares, y la mezcla resultante se incuba para proveer un suero en proceso para pruebas tanto preliminares como confirmatorias.



En el procedimiento de prueba preliminar se mezclan porciones iguales del suero tratado y un reactivo de diagnóstico inmunológico especial, en un porta-objetos de vidrio. Ocurre una reacción positiva al cabo de un

5. minuto como evidencia de la presencia de un agregado coloidal visible. El procedimiento de prueba confirmatorio utiliza una técnica similar si bien más refinada y discriminatoria que emplea cantidades medidas de manera

10. más precisa del suero procesado y del reactivo de diagnóstico, tras de lo cual se entremezclan y se hace una lectura macroscópica del régimen de sedimentación dentro de la mezcla. El reactivo de diagnóstico inmunológico es una suspensión de látex en una solución amortiguadora

15. salina. La suspensión contiene partículas de poliestireno revestidas con una fracción de globulina.

#### ANTECEDENTES Y RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la indicación de la hepatitis. De manera más particular, concierne a un

20. procedimiento nuevo y mejorado de diagnóstico para la indicación selectiva de la hepatitis, incluyendo pruebas serológicas y los reactivos de prueba que se emplean.

Si bien la ocurrencia y la transmisión de la hepatitis es relativamente común, su etiología no ha sido documentada o aislada completamente. Se creó por lo general que

25. la enfermedad es de naturaleza viral y que puede ser transmitida por el agua de beber contaminada, los mariscos crudos, las malas condiciones de salubridad o las transfusio-



nes sanguíneas. Cuando se transfiera por transfusión, se le llama por lo común "hepatitis de suero" para diferenciarla de la "hepatitis infecciosa" o epidémica, si bien los dos tipos de hepatitis están muy próximamente relacionados. De acuerdo con lo anterior, a menos de que se especifique de otro modo, el término "hepatitis" tal como se usa en la presente, se pretende que incluya la hepatitis tanto infecciosa como de suero.

Durante muchos años los investigadores han intentado obtener una comprensión más completa del papel patológico de los procesos inmunológicos en el hígado dañado por la hepatitis. Si bien los resultados de estas investigaciones han conducido a muchas teorías sin comprobación, se ha establecido que los niveles de concentración de las inmunoglobulinas del suero cambian por lo general en el caso de las enfermedades del hígado, y se han encontrado elevadas concentraciones en los casos de hepatitis, cirrosis y enfermedades colágenas. Este aumento de la concentración de inmunoglobulinas puede percibirse por el gran número de células formadoras de globulina en el brazo de pacientes con hepatitis y otras enfermedades del hígado. Por desgracia, la elevación de la concentración de la globulina, y en particular de la gamma-globulina, no depende de la causa específica de la enfermedad del hígado de manera que no pueden determinarse la naturaleza exacta de la enfermedad simplemente percibiendo el aumento en el número de células formadoras de globulina. En los años recientes ha evolu-



- cionado cierta especificidad y se cree ahora que la concentración de gamma-A-globulinas se eleva cuando la enfermedad del hígado es hepatitis, cirrosis, artritis reumatoide o enfermedades colágenas y que la gamma-M-globulina.
5. aumenta debido a otras enfermedades del hígado como la cirrosis biliar.

- Es sabido también que los pacientes con hepatitis y otras enfermedades del hígado manifiestan con frecuencia una alta incidencia de falsas pruebas serológicas positivas de otras condiciones. Por ejemplo, existe una frecuente
10. incidencia de pruebas serológicas positivas falsas de sífilis en casos de hepatitis aguda, cirrosis y cirrosis biliar, a la vez que en muchos casos de hepatitis se obtienen reacciones serológicas positivas falsas del factor reumatoide.
15. toide.

- De acuerdo con lo anterior, el objeto principal de la presente invención es proveer un medio seguro para percibir de manera selectiva la hepatitis infecciosa y de suero.

20. Otro objeto de la presente invención es proveer un procedimiento de prueba serológico inmunológico nuevo y mejorado y reactivos de prueba para la indicación y el diagnóstico de la hepatitis tanto de suero como infecciosa. Se incluye dentro de este objeto proveer un procedimiento de
25. prueba de diagnóstico específico que permita al clínico diferenciar entre la hepatitis y otras enfermedades del hígado.

Un objeto más de la presente invención es proveer



- un procedimiento de prueba de diagnóstico nuevo y mejorado y reactivos de prueba que no solo permiten la diferenciación antes mencionada entre la hepatitis y otras enfermedades del hígado sino que permiten también al clínico establecer esta
5. diferenciación de una manera rápida y reproducible sin realizar biopsias dolorosas del hígado o gran número de operaciones químicas del hígado que consumen mucho tiempo, efectuando así una economía substancial tanto de tiempo como de costo.
10. Un objeto adicional de la presente invención es proveer un método para concentrar y percibir un factor específico indígena de la hepatitis del suero y la hepatitis infecciosa, que permite establecer un diagnóstico rápido y a la vez seguro.
15. Otro objeto de la presente invención es proveer un procedimiento de prueba nuevo y mejorado que evita el alto porcentaje de reacciones no específicas de una naturaleza positiva falsa o negativa falsa causadas no solo por enfermedades del hígado diferentes a la hepatitis sino también
20. por otros factores que pueden encontrarse presentes en las muestras de sangre de personas normales, tales como la sangre hemolizada, sueros que contienen estromas de glóbulos rojos de la sangre o sangre de pacientes que han sufrido recientemente procedimientos de circulación extracorpó-
25. rea o que han recibido recientemente una terapia a base de cortisona.

Otro objeto de la presente invención es proveer



un procedimiento de prueba altamente selectivo y seguro para el diagnóstico de la hepatitis que puede distinguir también entre la hepatitis infecciosa y la de suero.

- Otro objeto más de la presente invención es pro-
5. veer un procedimiento de prueba de diagnóstico nuevo y mejorado y reactivos de prueba del tipo descrito que permiten a los bancos de sangre y a los fabricantes de productos de sangre catalogar a los donantes de sangre de una manera simple y efectiva y percibir a los donantes que son
10. portadores de hepatitis. Con lo cual se reduce substancialmente, si no es que se elimina por completo, la transmisión de la hepatitis a través de la transfusión de sangre o de productos de la sangre.

- Aún otro objeto de la presente invención es pro-
15. veer un procedimiento de prueba de diagnóstico para la hepatitis que es efectivo para producir resultados de prueba positivos desde un mes antes de haberse declarado la enfermedad hasta aproximadamente 12 meses después.

- Otros objetos serán entendidos en parte de manera
20. obvia y en parte serán señalados más adelante.

- Estos, y otros objetos relacionados, se consiguen de conformidad con la presente invención, proyectando un procedimiento de prueba de diagnóstico que comprende la fraccionación criogénica de suero de sangre humana que se
25. va a someter a prueba para efectuar la concentración y separación de un factor de hepatitis dentro de una fracción criogénica, seguida por la detección subsecuente del



factor con un reactivo de diagnóstico inmunológico adecuado para proveer una indicación demostrativa de la presencia de hepatitis infecciosa o de suero.

Una mejor comprensión de estos objetos y ventajas

5. de la presente invención, así como de las varias etapas y la relación de una o más de esas etapas con respecto a cada una de las otras, y las características, propiedades e interacciones de las composiciones, se obtendrán a partir de la siguiente descripción detallada que expone una modalidad preferida de la invención e indica la manera como los principios de la invención se emplean.

#### DESCRIPCION DE UNA MODALIDAD PREFERIDA

- El método de prueba de diagnóstico de la presente invención comprende en general la fraccionación de suero
15. de sangre humana que se va a someter a tratamiento como para concentrar un factor específico indígena de la hepatitis dentro de una fracción selecta, seguida por la separación de esa fracción y su preparación para procedimientos de prueba inmunológico tanto preliminares como confirmatorios. Para obtener los mejores resultados el suero que va a ser sometido a tratamiento debe encontrarse libre de hemolisis o estromas de glóbulos rojos de la sangre, puesto que esos sueros dan una reacción positiva débil con los reactivos de prueba de diagnóstico. Esos resultados débiles pueden distinguirse
  20. de los resultados producidos por la hepatitis pero pueden conducir a cierta confusión. De acuerdo con lo anterior, se prefiere por lo general que la sangre que se va a someter



a tratamiento sea tomada por venopuntura. El suero de la sangre se obtiene de manera convencional y de conformidad con la presente invención se somete a un craqueo o fraccionación criogénica, que se cree que causa la migración

5. del factor específico de la hepatitis al fondo del suero. Se añade un reactivo de proceso de glicina-salina selecto, de concentración y pH particulares, a la fracción criogénica, después de su separación, y la mezcla resultante se incuba durante un corto período. La solución incubada, a

10. la que se llama "suero procesado", se emplea entonces para los procedimientos de prueba tanto preliminares como confirmatorios. En el procedimiento de prueba preliminar se mezclan porciones substancialmente iguales del suero procesado y de un reactivo de diagnóstico inmunológico especial en un

15. porta-objetos. Ocorre una reacción positiva en el transcurso de un minuto y que es claramente evidente por la formación de un agregado pesado floculante o coloidal, que resulta cuando se encuentra presente la hepatitis. El procedimiento de prueba confirmatorio emplea la misma reacción inmuno-

20. lógica pero utiliza una técnica más refinada y discriminatoria empleando cantidades medidas de manera más precisa del suero procesado y del reactivo de diagnóstico, tras de lo cual se entremezcla y se hace una lectura macroscópica del régimen de sedimentación dentro de la mezcla.

20.

#### FRACCIONACION DEL SUERO

Como se ha mencionado, es imperativo, en el procedimiento de prueba de la presente invención, que el suero que se va a probar se someta a fraccionación criogénica, an-



tes del tratamiento con los reactivos de prueba de diagnóstico. La fraccionación criogénica del suero tiene lugar durante un período de más de una hora y, de preferencia, de aproximadamente dos horas o más, para permitir la migración del factor de la hepatitis y su concentración cerca del fondo de la muestra de prueba. De conformidad con el método preferido, el suero se coloca en un tubo de ensayo seco y limpio y se inserta en un congelador que tiene una temperatura ambiente muy inferior a la temperatura de congelación del suero. En la práctica, se ha encontrado satisfactoria una temperatura de aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ . El suero se solidifica lentamente y al suceder esto se facilita la migración hacia abajo o crioprecipitación del factor de la hepatitis. Después de un período de aproximadamente 2 horas o más, el tubo de ensayo se quita del congelador y se le permite alcanzar la temperatura ambiente sin suministrarle calor adicional o perturbar de alguna otra manera la colocación relativa de los componentes del suero. El suero manifiesta tres o cuatro capas fácilmente perceptibles al completarse el proceso de descongelación.

Si bien ni la invención misma ni cualquier aspecto de la misma deberá considerarse restringido a una teoría particular de operación, una explicación teórica limitada ayudará a comprender la invención. Se supone teóricamente que la concentración de inmunoglobulina elevada en la sangre de pacientes con hepatitis, resulta de un procedimiento que difiere de las otras enfermedades del hígado.



- Además, se cree que las personas que han contraído la hepatitis infecciosa o de suero, o se encuentran expuestas a la misma, manifiestan un factor de aglutinamiento de globulina diferente en el suero, tal vez de la naturaleza de un "haptén". Este factor se encontrará dentro de las setenta y dos horas después de la exposición y será llamado en adelante el "factor de la hepatitis". Se cree que reacciona enzimáticamente con el hígado en presencia de un acelerador desconocido de manera que el aumento de concentración de inmunoglobulina en los casos de hepatitis no se debe solamente a la producción de anticuerpos sino que se debe cuando menos en parte a un reemplazo de los anticuerpos que reaccionan en forma aglutinante con el factor de la hepatitis.
- 5.
- 10.
15. El componente complejo resultante de la reacción del factor de la hepatitis con la inmunoglobulina tiende a actuar de manera similar a las globulinas y durante la operación de congelación emigra hacia el fondo del suero, efectuando así una estratificación o craqueo criogénico del suero. Es claro que tiene lugar cierto viaje hacia abajo de la gamma-globulina al tener lugar la congelación y se teoriza que concentrando las globulinas dentro de cierta porción del suero, el factor de la hepatitis se concentrará también dentro de esa región.
- 20.
25. Como se ha mencionado, cuando el suero es descongelado lentamente se separa en una pluralidad de capas perceptibles o estratos que pueden separarse sin dificultad.



- Se ha establecido por mediciones electroferéticas que la gran concentración de gamma-globulinas se encuentra en la capa del fondo o crioprecipitado de un suero fraccionado criogénicamente. Además los resultados de prueba
5. positivos y reproducibles, obtenidos usando el procedimiento de la presente invención, manifestaron una reacción de prueba cien por ciento positiva con la capa del fondo, mientras que la capa media dió un resultado de prueba positivo de 42.8 % y la capa superior dió una
10. reacción de prueba positiva de solo 11.4 %. Por supuesto, se apreciará que el craqueo criogénico del suero puede tender a aislar también a los inhibidores del factor de hepatitis u otros materiales de las capas superiores, permitiendo así los resultados positivos consistentes y repro-
15. ducibles de la capa del fondo. Esta posibilidad es reforzada por los falsos resultados negativos manifestados por otras muestras de suero no fraccionado.

- Si no se toma el cuidado debido, puede resultar la recontaminación de la capa del fondo con una pequeña cantidad de una de las capas superiores durante la separación de las tres capas. En el caso de una ligera contaminación por un pequeño porcentaje de la capa superior puede esperarse ciertas reacciones falsas positivas. Los estudios han demostrado que aproximadamente el 2% de reacciones falsas positivas puede atribuirse a tal contaminación.
20. Sin embargo, estas falsas reacciones positivas pueden eliminarse extrayendo con pipeta con extremado cuidado la
- 25.



capa del fondo cuando se separen los sueros y asegurándose del craqueo criogénico completo de los sueros, es decir, manteniendo los sueros en estado congelado durante un período de tiempo más prolongado o repitiendo la fracción. En este sentido, se ha encontrado que dejando el suero en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante cuando menos 2 horas por lo general se obtienen resultados satisfactorios.....

Como una indicación de la presente invención, la prueba de la presente invención se llevó al cabo usando sueros con grupo de testigo clínicamente libre de hepatitis. En este grupo hubo 320 casos (32.5 %) que dieron reacciones débiles positivas en el procedimiento de prueba preliminar de la presente invención cuando se utilizó un suero no totalmente fraccionado. Con la excepción de cuatro casos (0.42%), estas reacciones fueron eliminadas cuando los sueros se procesaron de conformidad con la técnica criogénica de la presente invención. Uno de los cuatro fué hospitalizado 34 días después de haber realizado la prueba y su hospitalización dió como resultado un diagnóstico de hepatitis infecciosa. Las tres personas restantes continuaron asintomáticas. Cuando se utilizó el suero no totalmente fraccionado al paciente cuya hepatitis había sido determinada, el 4.1% del grupo de control dió resultados de prueba negativos. Sin embargo, cuando los sueros se separaron criogénicamente de conformidad con el procedimiento de la presente invención, los sueros de todos los pacientes de hepatitis manifestaron reacciones positivas



notables. En este sentido, debe advertirse que las reacciones no dependieron del complemento puesto que el complemento se desactivó a propósito calentándolo durante media hora a 58°C.

5. De conformidad con la teoría postulada en relación con la migración de las inmunoglobulinas durante la separación criogénica, se hicieron determinaciones electroforéticas del contenido proteínico de los sueros tanto en sueros enteros como en el material criogénicamente craqueado.
10. Con el material criogénicamente fraccionado la capa superior de los sueros manifestó un aumento de la albúmina mientras que la capa media manifestó un aumento moderado de la albúmina y un aumento ligero de las fracciones de proteína alfa y beta. La capa del fondo o crio-
15. precipitado de los sueros manifestó el mayor aumento en el contenido de gamma-globulina con disminución de la fracción de albúmina.

#### PROCESADO DE LA FRACCION CRIOPRECIPITADA

20. Como se ha mencionado antes, el material que se va a someter a los procedimientos de prueba preliminares y confirmatorios de la presente invención es una mezcla incubada formada por fracción crio-precipitada y una solución de procesado específica. La mezcla contiene de aproximadamente 6% a 9% de crio-precipitado y se le deja incubar durante un
25. período de tiempo suficiente para separar el factor de la hepatitis de la inmunoglobulina para su detección subsecuente. Si bien el período de incubación puede variar ligera-



- mente se ha encontrado que es por lo general suficiente un período de aproximadamente 15 minutos cuando la mezcla se mezcla o se agita intermitentemente. Este período de incubación ha sido estudiado por electroforésis para
5. proporcionar una mejor comprensión de los mecanismos funcionales del procedimiento. Como se ha mencionado, el crioprecipitado manifiesta un aumento del contenido de gamma-globulina. Sin embargo, después de permitir que la mezcla del crioprecipitado y la solución de procesado reposen a la temperatura ambiente durante 5 minutos, se ha demostrado por electroforésis que hay una disminución marcada en el contenido de gamma-globulina. Después de permitir que la mezcla repose a la temperatura ambiente durante 15 minutos la electroforésis indicó una ausencia completa
  15. de todas las inmunoglobulinas, siendo la albúmina la única fracción de proteína que quedaba en la mezcla. Así pues, es claro que el suero incubado o procesado utilizado en la presente invención no contiene gamma-globulina antes de los procedimientos de prueba preliminar y confirmatorio.
  20. Como el suero procesado ha sido confirmado consistente y seguramente por la presencia de hepatitis en suero en pacientes que se sabe que tienen hepatitis, se cree que la hipótesis relacionada con la presencia del factor de hepatitis está confirmada. Aparentemente, el complejo de factor
  25. y globulina del suero se disocia durante la fase de incubación del proceso. Esta disociación libera el factor de hepatitis y lo deja reaccionar con el reactivo de diagnós-



tico. El mecanismo parece ser específico a los casos de hepatitis y no depende de la presencia de inmunoglobulina dentro del suero.

La solución alcalina empleada de preferencia

5. en el procesado de la fracción de suero, es una solución acuosa de glicina (ácido aminoacético) y cloruro de sodio con un pH de aproximadamente 8.6 y 9.2. Los mejores resultados se han obtenido hasta ahora con un nivel de concentración de glicina de aproximadamente 0.1 moles por litro
10. y una concentración del cloruro de sodio de aproximadamente 0.3 moles por litro si bien la concentración de cloruro de sodio puede ser ligeramente menor variando hasta llegar a ser tan pequeña como de aproximadamente 0.2 moles por litro. El pH de la solución de glicina-salina puede ajustarse fácilmente al nivel deseado con una solución de hidróxido de sodio 0.1 molar y la solución contendrá por lo general también 0.1 % de azida de sodio como preservativo.

El crioprecipitado se mezcla con el reactivo

20. de procesado de glicina-salina en proporciones de aproximadamente 1:13 a aproximadamente 1:17. Estas proporciones pueden variarse ligeramente en tanto que se logre la desnaturalización deseada de la gamma-globulina, siendo la proporción preferida de aproximadamente 1:16. Como se ha
25. mencionado, el suero de procesado se usa para el procedimiento de prueba inicial y el confirmatorio después de incubar a la temperatura ambiente durante un período de



aproximadamente 15 minutos.

#### REACTIVOS DE PRUEBA

Los procedimientos de prueba de diagnóstico de la presente invención comprenden una reacción inmunológica

5. entre el factor de la hepatitis del suero procesado y la fracción de globulina contenida en el reactivo de diagnóstico. La reacción inmunológica tiene una forma similar a los sistemas convencionales de antígeno-anticuerpo, pero, debido al tamaño de partícula del agregado coloidal producido por la reacción, requiere el uso de un vehículo

10. para hacer más expedita la visualización macroscópica de una reacción en otra forma invisible. Para los fines de la presente invención se ha encontrado que dan excelentes resultados los vehículos de partículas de látex de un tamaño substancialmente uniforme, que proporcionan un grado

15. óptimo de especificidad y sensibilidad junto con una mejor velocidad y calidad de la reacción. Así, pues, tanto en los procedimientos de prueba preliminares como confirmatorio se emplea substancialmente el mismo reactivo de diagnóstico.

20.

El reactivo de diagnóstico mejorado de la presente invención es una solución salina alcalina de partículas de látex revestidas con una fracción de gammaglobulina. Se ha encontrado que las partículas de resinas orgánicas

25. sintéticas en la forma de una suspensión de látex son las más adecuadas para actuar como vehículo en tanto que el tamaño y la forma de las partículas se pueda controlar con



precisión. Es conveniente usar una partícula de forma y tamaño uniformes, por ejemplo esferas de un diámetro de entre aproximadamente de 0.5 y 1.0 micras. Las suspensiones de esas partículas pueden obtenerse por la polimerización

5. de la resina bajo condiciones controladas. Se prefiere particularmente las partículas de poliestireno de una forma en general esférica y un diámetro de 0.81 micras, con una desviación de aproximadamente solo 0.0063 micras. Esas esferas se cree que tienen un peso molecular de más de 200,000

10. y que están cargadas negativamente en suspensión.

Se obtiene una solución de base de partículas de látex de poliestireno mediante la dilución apropiada de la suspensión de látex en agua destilada estéril. El grado de dilución podrá variar dependiendo de la concentración

15. inicial de la suspensión y será por general una suspensión de base de 1:10. Sin embargo, de conformidad con la presente invención, se llega a la concentración apropiada cuando una solución que consiste de 0:1 ml. de solución de base y 10 ml. de agua permite una transmisión de luz de 5 % a

20. través de una muestra de 13 x 13 x 100 mm, medida en un espectrofotómetro Coleman (Modelo 11 o 14) a 650 m $\mu$  equipado con un filtro rojo. Si bien la solución de látex de base preparada de esta manera debe almacenarse por refrigeración durante períodos prolongados, no debe congelarse

25. para lograr los mejores resultados.

El reactivo de diagnóstico sera una solución salina alcalina de las partículas de látex revestidas con



- gamma-globulina humana, como por ejemplo, fracción Cohn II obtenida de suero humano o plasma fraccionados por los métodos 6 y 9 de Cohn y compuesta principalmente, si bien no exclusivamente, de gamma-globulina. El reactivo se prepara mezclando la solución de látex de base descrita con la gamma-globulina en presencia de un amortiguador adecuado. De acuerdo con lo anterior, para este fin, se prepara una solución amortiguadora de glicina-salina de concentración hasta cierto punto diferente a la usada durante el
5. procesado del suero fraccionado. Esto puede conseguirse sin dificultad ajustando el pH de una solución 0.1 molar de glicina a 8.2 con hidróxido de sodio 1N y luego disolviendo un poco menos de aproximadamente 0.2 moles de cloruro de sodio en la misma.
- 10.
15. La solución de base de la fracción de gamma-globulina humana para usarse como reactivos puede prepararse usando la solución amortiguadora arriba descrita. El reactivo es una fracción de gamma-globulina, previamente incubada a aproximadamente 57°C, durante de 15 a 30 minutos y
20. se usa en la forma de una solución al 1% del amortiguador. De conformidad con la modalidad preferida de la presente invención, el reactivo será la fracción II de gamma-globulina de suero humano combinados, es decir, la Fracción Cohn II. Sin embargo, puede emplearse también euglobulina o la
25. fracción II de gamma-globulina de pacientes con artritis reumatoide. Cuando la fracción de gamma-globulina tiene la forma de un sólido, un gramo de la misma puede disolver-



- se convenientemente en 100 ml. de solución amortiguadora usando incrementos de 5 a 10 ml., recogién dose el fluido supernatante de cada incremento hasta que el polvo se disuelve completamente. La solución puede entonces ser
5. centrífuga y filtrada para proveer la solución de base de fracción II de gamma-globulina al 1% desecada.

- El reactivo de diagnóstico de Látex-globulina deseado se obtiene entremezclando las soluciones de base de látex de poliestireno, reactivo de gamma-globulina y
10. amortiguadores de salina en proporciones adecuadas. La solución de látex y la solución de reactivos se mezclan en proporciones de aproximadamente 1:5 y luego se diluyen añadiendo aproximadamente 100 partes por volumen de amortiguador para dar la formulación de reactivo final. Esto dará
  15. como resultado la concentración de partículas de látex substancialmente igual a la usada para determinar la dilución apropiada de la solución de base. La concentración resultante de la fracción de globulina será de aproximadamente 0.05%. Puede añadirse aproximadamente 0.1% de azida
  20. de sodio al reactivo como preservativo y la solución resultante almacenarse bajo refrigeración.

#### PROCEDIMIENTOS DE PRUEBA

- Los procedimientos de prueba de diagnósticos utilizados de conformidad con la presente invención incluyen
25. operaciones de prueba tanto preliminares como confirmatorias. La prueba preliminar proporciona una determinación extremadamente rápida de la posible existencia de hepati-



tis infecciosa o de suero mientras que el procedimiento de prueba confirmatorio dura sólo ligeramente más tiempo pero es mucho más discriminatorio en sus resultados.

La prueba preliminar comprende simplemente el

5. entremezclado de porciones iguales, por ejemplo, de 0,05 ml. de tanto el suero procesado como el reactivo de diagnóstico de látex-globulina en un porta-objetos. Después de hacer oscilar suavemente el porta-objetos hacia atrás y hacia adelante aproximadamente un minuto para asegurar la inter-
10. acción, los resultados se leen macroscópicamente por la trans-iluminación del portaobjetos. Una reacción positiva se caracteriza por una fuerte aglutinación, es decir, la formación de agregados coloidales visibles de un carácter regular e individual, en oposición a una forma coloidal
15. irregular que puede caracterizarse mejor como un gel. En el caso de la reacción positiva de la prueba en el porta-objetos deberá realizarse la prueba confirmatoria.

- Pueden obtenerse reacciones positivas falsas en la prueba en el porta-objetos a partir de sangre hemolizada o suero que contenga estromas de glóbulos rojos.
20. Sin embargo, este tipo de reacción es marcadamente diferente, al producido por hepatitis. La reacción con estromas da como resultado un tipo suelto como de hojuelas e irregular de aglutinación categorizado como un gel, en com-
  25. paración con los agregados coloidales regularmente formados que indican la prueba positiva de la hepatitis.



El procedimiento de prueba confirmatorio se lleva al cabo en un tubo de reacción capilar calibrado que tiene una primera marca a los 0.03 ml. y una segunda marca a los 0.07 ml. El reactivo de látex-globulina se introduce primero al tubo capilar hasta que llega a la marca de 0.03 ml. Luego se introduce el suero procesado al capilar usando el mismo extremo de entrada hasta que la parte superior del reactivo de diagnóstico llega a la marca de 0.07 del capilar. Las soluciones dentro del capilar se entremezclan invirtiendo repetida y suavemente el tubo capilar diez o más veces para permitir la interacción completa entre los materiales que llevan cargas de polaridad opuestas, es decir, las partículas de poliestireno-globulina cargadas negativamente y el factor de hepatitis cargado positivamente. El tubo se invierte finalmente y se monta dentro de una capa de arcilla que sirve para sellar el extremo del capilar en un medio eléctrico neutro a la vez que se mantiene el tubo erecto para observar la aglutinación y la sedimentación dentro de la mezcla. Por lo general la aglutinación o floculación ocurre dentro de los 15 a 20 minutos en el caso de hepatitis tanto infecciosa como de suero y el régimen de sedimentación puede seguirse con facilidad durante un transcurso de tiempo de aproximadamente una hora. Durante este tiempo, se toman lecturas a intervalos frecuentes, por ejemplo de cada 10 o 15 minutos, y se anota cualquier diferencia en el régimen de sedimentación. El régimen de sedimentación para la hepatitis infecciosa y de suero es



substancialmente diferente al causado por los sueros hemolizados. De hecho, la sedimentación resultante del caso de hepatitis se termina por lo general en de 15 a 20 minutos antes que la causada por los sueros hemolizados. Se ha encontrado también que el método de prueba confirmatorio produce un resultado negativo dentro de una hora en todos los casos cuando la prueba preliminar ha dado resultados positivos falsos débiles debido a una terapia de cortisona y a estromas de glóbulos rojos de la sangre.

5. 10. Las diferencias arriba indicadas en el régimen de sedimentación podrán apreciarse mejor tomando en consideración la dinámica del sistema. Es sabido que si las partículas de una suspensión iso-dimensional se dejan asentarse por su propia cuenta, tienden a empacarse por sí mismas de manera tal que resulta un sedimento con energía libre mínima. Esto significa que las partículas se alinearán con sus superficies grandes quedando opuestas entre sí. Las capas solvatadas no cambiadas o lioesféricas actuarán de esta manera como un lubricante que permitirá que las partículas se deslicen sobre sí mismas hasta que hayan alcanzado sus lugares apropiados. El cambio de polaridad resultante de la presencia del factor de hepatitis y la eliminación resultante de la fuerza autorepelente del poliestireno permiten que la escala de sedimentación sea proporcional a la masa de agregados coloidales de que se trate. Las partículas neutralizadas tenderán entonces a coalescerse o a adherirse entre sí para formar
- 15.
- 20.
- 25.



agregados coloidales que dan como resultado un empaque comparativamente suelto y una aceleración del régimen de sedimentación. Además, las capas solvatadas de las partículas presentadas en primer término son distorsionadas por la presión ejercida sobre ellas y esto a su vez ayuda a las partículas restantes a entrar en reposo más rápidamente.

Se apreciará que la combinación de partículas de estireno-globulina con el factor de hepatitis dá como resultado una partícula coloidal primaria de tamaño submicroscópico que manifiesta solo discontinuidades discretas. Estas partículas coloidales primarias se asocian entonces sin perder su individualidad para formar los agregados coloidales visuales característicos de una reacción de prueba positiva. Sin embargo, en el caso de sueros hemolizados o sueros que contienen estromas de glóbulos rojos, las partículas sobrepasan la escala coloidal y forman un aglutinado en hojuelas irregular, clasificados como un gel, más que como un agregado coloidal verdadero. La diferencia visual entre la formación de gel y la formación de agregado coloidal puede distinguirse fácilmente en particular cuando se acopla a la diferencia de régimen de sedimentación.

El procedimiento de prueba de la presente invención hace posible también distinguir entre la hepatitis de suero y la hepatitis infecciosa aún cuando se cree que ambas son causadas por el mismo agente etiológico. Siguiendo cuidadosamente el régimen de sedimentación en el procedimiento de prueba confirmatorio, podrá observarse que todos



los casos de hepatitis infecciosa manifiestan un régimen de sedimentación más rápido que el de los de hepatitis de suero. Se cree que esta diferencia se debe a los factores asociados con los pacientes individuales, como son la vía de transmisión, la concentración de gamma-globulina y las condiciones generales del hígado, así como los medicamentos recibidos por los pacientes individualmente.

En la tabla 1, se registran resultados típicos logrados utilizando los procedimientos de prueba preliminares y confirmatorios de la presente invención, con respecto a un gran número de enfermedades del hígado relacionadas.



TABLA I

Enfermedades estudiadas	Número de sueros estudiados	Prueba Preliminar		Confirmatoria	
		Negativa	Positiva	Negativa	Positiva
Hepatitis infecciosa	140	0	140	0	140
Hepatitis de suero	78	0	78	0	78
Artritis reumatoide	18	16	2 <sup>+</sup>	18	0
Fiebre reumática	38	38	0	38	0
Coma hepático <sup>---</sup>	17	17	0	17	0
Mieloma múltiple	6	5	1 <sup>+</sup>	6	0
Cáncer del hígado	6	6	0	6	0
Lupus eritematoso	2	2	0	2	0
Bacterias sub-agudas (endocarditis)	4	3	1 <sup>+++</sup>	3	1 <sup>+++</sup>
Mononucleosis infecciosa	24	21	3 <sup>-</sup>	23	1 <sup>-</sup>
Ictericia obstructiva	5	5	0	5	0
Cirrosis alcohólica	73	73	0	73	0
Anemia por eritrocitos anormales	12	12	0	12	0
Anemia de Cooley	3	3	0	3	0

<sup>-</sup> Débilmente positiva --el paciente había recibido terapia con cortisona.

<sup>---</sup> 6-- cirrosis alcohólica                      2-- envenenamiento con insecticida

1-- envenenamiento con tetracloruro                      4-- de origen desconocido

4-- sobredosis de barbitúricos

<sup>+++</sup> El paciente tenía un proceso hemolítico, la hemoglobina del plasma fué de 0.06 gr.



Como puede verse por la Tabla I se obtuvieron resultados de prueba positivos en 100% de los casos en que había hepatitis infecciosa o de suero y se obtuvieron resultados negativos en aproximadamente el 99% de todos los casos de enfermedades del hígado aparte de la hepatitis de suero e infecciosa.

Para el fin de valorar mejor el procedimiento de prueba, se realizaron ciertas pruebas en conjunto con la bilirubina de suero y la transaminasa pirúvica de suero (S.G.P.T.). La concentración de bilirubina a los casos de hepatitis de suero infecciosa variaron de 1.8 mg, por ciento a 19 mg. por ciento y los valores de transaminasa pirúvica variaron de 34 unidades a 1400 unidades. Cuando se realizaron procedimientos de prueba de la presente invención en estos pacientes se obtuvieron resultados positivos hasta el décimo-sexto mes después de haberse declarado la hepatitis. Once casos de hepatitis conocida se siguieron sobre una base mensual y los resultados de prueba siguieron siendo positivos durante un promedio de once meses después de haberse declarado la enfermedad.

Los ejemplos siguientes se dan para el fin de que pueda comprenderse de manera más completa la efectividad de la presente invención. Estos ejemplos se presentan con fines de ilustración solamente y no se pretende de manera alguna limitar la práctica de la invención.



### EJEMPLO 1

- Se tomaron aproximadamente 8 ml. de sangre humana de un paciente que se creía que tenía hepatitis, teniendo cuidado de evitar la hemólisis removiendo la aguja de la
5. jeringa antes de colocar la muestra de sangre en un tubo de ensayo. La muestra de sangre se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min. y el suero supernatante se decantó a un tubo de ensayo seco y limpio. El suero se colocó en un congelador y se dejó permanecer ahí durante 2 horas, a una
  10. temperatura de congelador de aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ . Después de remover del congelador el suero se dejó descongelarse completamente a la temperatura ambiente sin agitarlo. Una vez que el suero hubo llegado a la temperatura ambiente la mayor parte de la capa del fondo del suero desconge-
  15. lado se separó cuidadosamente con una pipeta y se descargaron las capas superiores de suero.

- Se preparó un reactivo de proceso como sigue: se disolvieron 7.8 gramos de glicina y 17 gramos de cloruro de sodio en un litro de agua y se ajustó el pH de la solución
20. a entre 8.6 y 9.2, con una solución de hidróxido de sodio al 10 por ciento. A esto se añadió 0.1% de azida de sodio como preservativo.

- Se pasaron aproximadamente 0.8 ml de la solución de proceso por medio de una pipeta a un tubo de ensayo limpio y seco al cual se añadió 0.05 ml. de la capa del fondo del suero. La mezcla resultante se dejó reposar a la temperatura ambiente para un periodo de incubación de apro-
- 25.



ximadamente 15 minutos, agitando la mezcla cada 5 minutos durante el período de incubación. El producto resultante será llamado en adelante suero procesado.

- Usando precauciones de esterilidad, se preparó
5. un reactivo de diagnóstico de látex y gamma-globulina a partir de 0.5 ml de una solución de látex de base 1:10 y 0.5 ml de una solución de base de gamma-globulina al 1% (Fracción II de Cohn) y 10 ml. de una solución amortiguadora alcalina. Las soluciones de látex y gamma-globulina se mezclaron y se
  10. calentaron a 57°C durante de 15 a 30 minutos antes de añadir el amortiguador.

- La solución amortiguadora se preparó a partir de
15. 975 ml. de una solución de glicina 0.1 molar a la cual se añadieron 2.5 ml. de una solución de hidróxido de sodio 1N. Se añadió agua para hacer 1 litro de solución y se ajustó el pH a 8.2. A esto se añadió 10 gramos de cloruro de sodio para proporcionar la solución amortiguadora de base.

- Se diluyó una suspensión de látex de poliestireno de partículas de poliestireno de un diámetro promedio de 0.81
20. micras con agua destilada estéril hasta que la solución exhibió una transmisión de luz de 5% cuando se le diluyó apropiadamente y midiendo en un espectrofotómetro de la manera antes indicada. La solución de base es substancialmente una solución 1:10 de una suspensión de polímero con de
  25. 30 a 60% de sólidos.

Se preparó una solución de gamma-globulina al 1% de base disolviendo 1 gr. de la fracción de II de gamma-



globulina liofilizada de sueros humanos combinados en 100 ml. de solución amortiguadora de base.

- El procedimiento de prueba preliminar se llevó al cabo de la siguiente manera: se mezclaron aproximadamente 0.05 ml. de suero procesado y 0.05 ml. de reactivo de diagnóstico en un porta-objetos con una varilla de vidrio. El porta-objetos se hizo oscilar suavemente hacia atrás y hacia adelante durante un período de aproximadamente un minuto. La transiluminación del porta-objetos reveló una aglutinación fuerte dentro de la mezcla indicando una reacción positiva de hepatitis.

- Para confirmar los elementos de prueba se llenó un tubo de reacción capilar marcados con el reactivo de diagnóstico hasta la marca de 0.03 ml. Usando el mismo extremo del tubo capilar, el suero procesado se introdujo al tubo hasta que el reactivo llegó a la marca de 0.07 ml. del tubo. Las soluciones del tubo capilar se mezclaron suavemente inclinando el tubo aproximadamente diez veces después de lo cual el tubo se invirtió y se colocó en posición vertical dentro de una capa de arcilla. Al cabo de 20 minutos, la solución manifestó una aglutinación fuerte indicando una reacción positiva de hepatitis infecciosa.

#### EJEMPLO II

- Se hizo una prueba con un grupo de testigo de pacientes a los cuales previamente se había determinado como clínicamente negativos en relación a la hepatitis de conformidad con el procedimiento de prueba de la presente in-



vención usando los procedimientos y reactivos substancialmente idénticos a los indicados en el ejemplo I. El número total de sueros probados fué de 1879. De este número, se obtuvieron 24 casos o sea el 1.3% con reacciones de prueba 5. positivas. De entre estos 24 se encontró que 10 eran casos de hepatitis y 4 eran asintomáticos pero se les ha continuado vigilando. No fué posible seguir los restantes 10 casos.

EJEMPLO III

10. Se probó otro grupo de 1425 pacientes en un estudio a ciegas usando reactivos y procedimientos substancialmente idénticos a los indicados en el ejemplo I: La única información suministrada antes de hacer la prueba es la de que estos pacientes tenían enfermedades del hígado. Dentro de este grupo se obtuvieron resultados de prueba positivos 15. en 31 (5.5%) pacientes. Más tarde se manifestó que estos 31 casos eran el número total de casos de hepatitis conocidos incluidos en el grupo de estudios a ciegas como testigos.

20. Se hizo una prueba con otro grupo de estudio a ciegas consistente de 1848 pacientes, de conformidad con el procedimiento de prueba de la presente invención. Este grupo consistió de 983 pacientes normales, 675 pacientes con enfermedades que no eran hepatitis de suero o infecciones y 190 casos conocidos de hepatitis. Cuando se hicieron las 25. pruebas de conformidad con la presente invención, se identificaron de manera positiva 189 casos de hepatitis y se encontró que 4 del grupo normal daban también resultados positivos.



#### EJEMPLO IV

En otro estudio selecto, se sometieron a prueba 190 casos de hepatitis conocidos de la manera indicada en el ejemplo I. Todos los 190 (100%) casos dieron reacciones de prueba positivas tanto en los procedimientos de prueba preliminares como en los confirmatorios.

En un estudio de campo, se sometieron a prueba 750 pacientes de conformidad con el procedimiento de prueba de la presente invención. De entre estos, 11 eran casos conocidos de hepatitis. El procedimiento de prueba de la presente invención puso en evidencia los 11 casos conocidos. En un estudio de campo separado de donantes de sangre, 21 (2.4%) de los sueros probados dieron resultados positivos con el procedimiento de prueba de la presente invención. Se ha comprobado en dos de estos resultados de indicación positiva, posteriormente, que se trataba de casos de hepatitis. Los otros 19 se han seguido.

Se encontró que el suero de pacientes que habían sufrido procedimientos quirúrgicos usando circulación extracorpórea daban reacciones positivas falsas de tipo de gel de hasta aproximadamente las primeras dos semanas después de la cirugía. En este grupo el 93% (465 de 489) dió un tipo de gel de aglutinación. El plasma promedio (hemoglobina) de estos pacientes fué de 0.08 gramos por ciento. Los pacientes de este grupo recibieron ya sea sangre entera sola, sangre enteraygamma-globulina o bien sangre entera gamma-globulina y fibrinógeno. Los resultados falsos posi-



tivos pudieron agruparse de la manera siguiente: (1) los pacientes que recibieron 2 unidades o más de sangre entera reaccionaron hasta el undécimo día; (2) los pacientes que recibieron sangre entera y gamma-globulina reaccionaron hasta el día décimo quinto, y (3) los pacientes que recibieron sangre entera, gamma-globulina y fibrinógeno reaccionaron hasta el décimo séptimo día. En todos los casos de pacientes quirúrgicos de circulación extracorpórea, a excepción de cinco, los sueros dieron resultados negativos después de los períodos arriba indicados. En los primeros cinco casos que son reacciones más prolongadas, tres fueron admitidos posteriormente al hospital con diagnóstico de hepatitis de suero.

Como puede verse por la descripción detallada anterior, la presente invención proporciona un procedimiento de prueba extremadamente seguro y altamente selectivo para detectar la hepatitis tanto infecciosa como de suero. Permite al clínico diferenciar rápidamente entre la hepatitis y otras enfermedades del hígado al mismo tiempo que evita un alto porcentaje de reacciones no específicas de una naturaleza falsa negativa o falsa positiva, incluyendo aquellas causadas por factores como son la sangre hemolizada, sangre que contiene estromas de glóbulos rojos, sangre de pacientes que recibieron terapia de cortisona y sangre de pacientes que habían sufrido recientemente procedimientos circulatorios extracorpóreos. El procedimiento de la presente invención hace posible también el aislamiento de un factor



específico de la hepatitis y utiliza un reactivo de diagnóstico específico que demuestra visiblemente la presencia del factor de hepatitis en el suero de sangre humana. El procedimiento de prueba de diagnóstico de la presente invención

5. es efectivo también para producir resultados de prueba positivos desde un mes antes de la declaración de la hepatitis aproximadamente 12 meses después de la ocurrencia de la enfermedad.

Como será evidente para las personas expertas en la técnica, pueden hacerse varias modificaciones, adaptaciones y variaciones a la exposición específica anterior sin alejarse de las enseñanzas de la presente invención.

10.

= . =





N O T A

Hecha la descripción del presente invento se hace constar, que esta solicitud se acoge a la prioridad de la solicitud de patente estadounidense Serial nº 883.261, depositada el 8 de Diciembre de 1969, y que se declaran como nuevas y de propia invención las reivindicaciones siguientes.

5. 1.- Procedimiento de prueba de diagnóstico para la indicación selectiva de la hepatitis que comprende un método para preparar suero de sangre humana para la detección inmunológica de hepatitis infecciosa o de suero, con las etapas de fraccionar criogénicamente el suero en una pluralidad de capas y separar subsecuentemente la capa más inferior para usarla en un procedimiento de prueba inmunológica.
10. 2.- Procedimiento, en cuyo método, de acuerdo con la reivindicación 1, dicho fraccionamiento criogénico incluye las etapas de hacer bajar lentamente la temperatura del suero a menos de su punto de congelación para causar la migración de, cuando menos, una porción del contenido de globulina, a la porción más inferior del suero y
15. 20.

A



subsecuentemente permitir que el suero se caliente a la temperatura ambiente en ausencia de agitación para producir la estratificación dentro del suero.

3.- Procedimiento, en cuyo método, de acuerdo con la reivindicación 1, la etapa de fraccionamiento orio-  
5. génico se lleva a cabo bajando la temperatura del suero a  $-20^{\circ}\text{C}$ . y manteniendo esa temperatura durante un período total de más de una hora.

4.- Procedimiento, en cuyo método, de acuerdo con la reivindicación 1, se incluye la etapa de incubar la capa  
10. de suero separada en presencia de una solución de glicina-salina que tiene un pH de la escala comprendido aproximadamente entre 8.6 y 9.2.

5.- Procedimiento, en cuyo método, de acuerdo con la reivindicación 1, se incluye la etapa de incubar la capa  
15. de suero separada en presencia de una solución salina alcalina que tiene una concentración de sal de, aproximadamente, 0,2 - 0,3 moles por litro.

6.- Procedimiento, en cuyo método, de acuerdo con la reivindicación 5, dicha incubación se lleva a cabo a la  
20. temperatura ambiente durante un período de cuando menos 15 minutos, aproximadamente.

7.- Procedimiento, en cuyo método, de acuerdo con la reivindicación 1, se incluye la etapa de incubar la capa  
25. de suero separada en presencia de una solución de glicina-



salina de 1 : 13 a 1 : 17, aproximadamente.

5. 8.- Procedimiento, con arreglo al cual para acondicionar una fracción de suero de sangre humana para determinar la reacción inmubológica definitiva, se forma una solución de la fracción en proceso con un reactivo de prueba que comprende una solución de glicina-salina que tiene un pH de la escala de 8,9 a 9,2 y una concentración de sal inorgánica de, aproximadamente, cuando menos 0,23 moles por litro.
10. 9.- Procedimiento, con arreglo al cual, de acuerdo con la reivindicación 8, la sal inorgánica es cloruro de sodio, con una concentración de, aproximadamente, 0,3 moles por litro, y la glicina se encuentra presente a una concentración de, aproximadamente, 0,1 moles por litro.
15. 10.- Procedimiento, con arreglo al cual, el precitado reactivo de prueba de diagnóstico inmunológico para detectar hepatitis infecciosa y de suero en sueros fraccionados criogénicamente, comprende una suspensión acuosa de partículas de resina sólida revestidas con una fracción de globulina en una solución salina amortiguadora alcalina, cuyas partículas de resina tienen un diámetro con promedio de 0,5-1,0 micras, aproximadamente.
20. 11.- Procedimiento, con arreglo al cual, el
- 25.



- precitado reactivo, de acuerdo con la reivindicación 10, tiene dichas partículas como partículas de poliestireno a una concentración sustancialmente igual a la concentración de partículas idénticas en una suspensión acuosa que
5. manifiesta una transmisión de luz de 5% medida por medio de un espectrofotómetro de 650 m $\mu$  equipado con filtro rojo.
- 12.- Procedimiento, con arreglo al cual, en el precitado reactivo, de acuerdo con la reivindicación 10,
10. tiene la concentración de la fracción de globulina 0,05% en peso, aproximadamente.
- 13.- Procedimiento, con arreglo al cual, de acuerdo con la reivindicación 10, en cuyo reactivo la solución amortiguadora es una solución de glicina-salina
15. que tiene un pH de 8,2 aproximadamente, una concentración de glicina de 0,1 moles por litro, aproximadamente y una concentración de sal de menos de 0,2 moles por litro, aproximadamente.
- 14.- Procedimiento, con arreglo al cual, de acuerdo con la reivindicación 10, en cuyo reactivo, las partículas de resina son partículas de poliestireno con un promedio de diámetro de 0,81 micras, aproximadamente.
- 15.- Procedimiento, que en su desarrollo para prueba xerológica para la detección inmunológica de hepatitis infecciosa o de suero en suero de sangre humana, com-
- 25.



- prende las etapas de fraccionar criogénicamente el suero en una pluralidad de capas, separar la capa más inferior, incubar la porción separada en presencia de una solución salina que tiene un pH de 8,6, aproximadamente, y durante un período de tiempo suficiente para proveer un suero resultante del proceso seguido que está sustancialmente libre de gamma-globulina, y subsecuentemente llevar el suero de ese proceso a un contacto íntimo con un reactivo que comprende una fracción de globulina humana revestida sobre partículas de vehículo para formar agregados coloidales macroscópicos que incidan una reacción positiva de la hepatitis infecciosa o de suero.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 16.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el fraccionamiento criogénico se lleva a cabo sometiendo el suero a una temperatura ambiente de  $-20^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente, durante total de tiempo de una hora, a lo menos, y permitiendo subsecuentemente que el suero se caliente a la temperatura ambiente en ausencia de agitación, para producir capas perceptibles dentro del suero.
- 17.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual la capa de suero separada se incuba en presencia de una solución salina alcalina y una concentración de sal inorgánica de 0,2 a 0,3 moles por litro, aproximadamente, durante un período de 15 minutos, aproximadamente.

*Handwritten signature or initials.*



18.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual la proporción de la capa de suero a solución salina es de 1 : 13 a 1 : 17, aproximadamente.

5. 19.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual las partículas de vehículo tienen un promedio de diámetro de 0.5 a 1,0 micras, aproximadamente, y la concentración de la fracción de globulina es de 0,05% en peso, aproximadamente.

10. 20.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual las partículas de vehículo son partículas de poliestireno y el reactivo incluye una solución amortiguadora de glicina-salina que tiene un pH de 8,2, aproximadamente, y una concentración de sal de menos de 0,2 moles por litro, aproximadamente.

15. 21.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el fraccionamiento criogénico se lleva a cabo sometiendo el suero a una temperatura ambiente de -20°C. aproximadamente, durante 2 horas, aproximadamente, y dejando que el suero se caliente a la temperatura ambiente en ausencia de agitación, y la solución salina es una solución de glicina-salina que tiene un pH de la escala de 8,6 a 9,2 y una concentración de sal de a lo menos 0,23 moles por litro, aproximadamente.

25. 22.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 21, en el cual la proporción de la capa de suero a so-

A



lución salina es de 1 : 16, aproximadamente, la concentración de cloruro de sodio es de 0,3 moles por litro, aproximadamente, y la concentración de glicina es de 0.1 moles por litro, aproximadamente.

5. 23.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el fraccionamiento criogénico se lleva a cabo sometiendo el suero a una temperatura ambiente de  $-20^{\circ}$ , aproximadamente, durante 2 horas, aproximadamente, y la solución salina es una solución de glicina-salina que tiene una concentración de sal de a lo menos de
10. 0.23 moles por litro, aproximadamente, siendo las partículas de vehículo partículas de poliestireno de menos de 1,0 micras y la concentración de la fracción de globulina de 0,05 por ciento en peso, aproximadamente.
15. 24.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el fraccionamiento criogénico se lleva a cabo sometiendo el suero a una temperatura ambiente de  $-20^{\circ}\text{C}$ ., aproximadamente, durante 2 horas, aproximadamente y permitiendo que el suero se caliente a la temperatura
20. ambiente en ausencia de agitación, incubándose la capa de suero durante 15 minutos, aproximadamente, a la temperatura ambiente en presencia de una solución de glicina-salina que tiene un pH de la escala de 8,6 a 9,2 y una concentración de sal de 0,3 moles por litro, aproximadamente,
25. siendo las partículas de vehículo partículas de poliestireno que tienen un promedio de diámetro de 0.81 micras,



aproximadamente, y una concentración de la fracción de globulina de 0,05%, aproximadamente, en peso, y el reactivo incluye una solución amortiguadora de glicina-salina que tiene un pH de 8,2, aproximadamente, y una concentración de sal de 0.14 moles por litro, aproximadamente.

10. 25.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el suero objeto del proceso y el reactivo se mezclan en proporciones aproximadamente iguales en un porta-objetos.

15. 26.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el suero objeto del proceso y el reactivo se mezclan dentro de un recipiente de reacción en proporciones de 4 : 3, aproximadamente.

20. 27.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual se incluye la etapa de observar el régimen de sedimentación de los agregados coloidales macroscópicos resultantes de la reacción durante un período de una hora y menos.

28.- Procedimiento de prueba de diagnóstico para la indicación selectiva de la hepatitis.

25. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 42 páginas foliadas y

A



y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 12 de Noviembre de 1970

JAMES F. McCULLER.

p.a.

~~P. P.~~ JAIME ISERN

Remite: JOSÉ RODRÍGUEZ

mpc.

A