

387961



387961

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

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de registro de una Patente de Introducción por diez años, en España, por "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA PREPARACION ANTIGENA PARA USO EN LA SERODIAGNOSIS DE LA SIFILIS", a favor de "FUJIZOKISEIYAKU COMPANY LIMITED", entidad de nacionalidad japonesa, residente en Tokyo (Japón), con domicilio en 724 Shimoochiai 2-Chome, Shinjuku-ku.

Debido al rápido progreso en el tratamiento de la sífilis con antibioticos, el número de enfermos de sífilis ha disminuido considerablemente en los últimos tiempos. Por otra parte, sin embargo, muchos enfermos sífilíticos son ahora aquéllos que tienen la sífilis latente, mientras que la mayoría de los enfermos con manifestaciones clínicas típicas de sífilis casi han desaparecido. Por consiguiente, se estima en la actualidad que el único procedimiento seguro para detectar la infección de sífilis reside en la prueba serológica.

5

10

Sabido es que la serodiagnosís de la sífilis fué

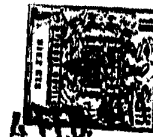
387961



- 2 -

creada por Wassermann al aplicar la prueba de fijación del
complemento establecida por Bordet y Gengocce para la diagnosis
de la sífilis. En la primera fase de la llamada diagnóstico se-
rológica de Wassermann de sífilis se utilizaba como antígeno
5 un extracto del hígado de niños sifiliticos congénitos. Esto
se basaba, naturalmente, en el concepto de que el Treponema
Pallidum (de ahora en adelante, en abreviatura, TP), el agente
causante de la sífilis, en organos de niños sifilíticos, ju-
garía un papel esencial como antígeno en la reacción especí-
fica anticuerpo-antígeno. En el curso de las subsiguientes in-
10 vestigaciones sobre la reacción Wassermann se descubrió que el
extracto de corazón bovino podia ser satisfactoriamente usado
como antígeno, en lugar del extracto de hígado de niño sifili-
tico, y que la actividad del extracto de corazón bovino como
15 antígeno en la reacción de Wassermann se debia a sustancias li-
pides. Además, en 1942, la cardiolipina, un fosfolípido, fué
aislada en forma pura de estas sustancias lipides por Pangborn,
clasificándose también su estructura química. Esta purificación
del antígeno, junto con una mejora de los procedimientos téc-
nicos de prueba, produjeron un rápido profreso en la aplicación
20 de la reacción de Wassermann (este método se denominará, de
ahora en adelante, "método de cardiolipina").

Sin embargo, se ha descubierto que este método mejo-
rado presenta aún la desventaja consistente en que, a veces,
25 produce la llamada reacción no específica, es decir, la falsa
reacción positiva biológica (en abreviatura, a partir de ahora,
FPB), en aquellos enfermos que nunca han sido infectados con
TP, porque la sustancia antigénica usada en este método no se
deriva del agente mismo causante de la sífilis. Así, se ha de-
30 mostrado que la incidencia de FPB alcanza casi al 20% de los



enfermos que dan reacción positiva a esta prueba de Wassermann.

Para evitar la FPB provocada por el antígeno de Cardi-
lipina, por tanto, se consideró necesario aplicar TP, el
agente mismo causante de la sífilis, como antígeno en la prue-
5 ba serológica de la sífilis. Desde este punto de vista, se -
han desarrollado en el método de prueba diversas modificacio-
nes tales como la prueba de inmovilización del Treponema pa-
llidum (que, para abreviar, se designará de ahora en adelante
como "prueba ITP"), basada en la reacción de inmovilización
10 de TP; la prueba de fijación del complemento del Treponema
pallidum (prueba FCTP), basada en la reacción de fijación del
complemento por el antígeno TP; y la prueba del anticuerpo
Treponemal Fluorescente (prueba ATF) basada en la reacción -
del anticuerpo fluorescente. Estos métodos de prueba parecen
15 haber sido considerablemente efectivos en la reducción de in-
cidencia de FPB. Pero su uso no se ha generalizado aún para
la diagnóstico de sífilis en lugar del método convencional de
Cardiolipina. La razón de esta impopularidad es la siguiente:
20 Como la prueba de rutina debe ser realizada en un gran núme-
ro de muestras de suero, cualesquiera métodos de diagnóstico
que se empleen en la práctica clínica deben ser simples en sus
* técnicas de reacción y, particularmente en el caso del método
en que se utiliza TP como antígeno, deben ser aquéllos que -
25 puedan dar el mejor resultado de prueba con la mínima canti-
dad de TP, porque el TP sólo puede desarrollarse en el -
parénquima de testículo de un conejo. Actualmente, sin embar-
* go, todos esos métodos que usan TP como antígeno resultan bas-
tante complicados en sus técnicas de reacción y requieren una
30 gran cantidad de TP, lo cual constituye un serio inconvenien-
te de esta clase de métodos.

Así, es prácticamente imposible la aplicación de es-



tos métodos como métodos rutinarios de prueba, aún cuando tengan la ventaja de una gran especificación en la reacción de anticuerpo-antígeno.

5 En estas circunstancias, Rathlev y otros trataron de establecer un método basado en la hemaglutinación (aglutinación de un portador) porque era simple en su técnica de reacción. El comportamiento de este método puede ser brevemente descrito como sigue: Los componentes celulares de TP son adsorbidos en algunos portadores tales como eritrocitos de oveja
10 tratados con formalina o con ácido tánico a fin de sensibilizarlos y los portadores sensibilizados son añadidos a las muestras de suero de prueba que han sido previamente diluídas con sustancia salina fisiológica u otra solución.

15 Los resultados de la prueba son considerados positivos o negativos de acuerdo con la presencia o ausencia de aglutinación de los eritrocitos sensibilizados, que se produce como resultado de la reacción del anticuerpo contenido en las muestras de suero de prueba con el antígeno TP adsorbido en los portadores (reacción antígeno-anticuerpo).

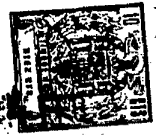
20 En la aplicación práctica, sin embargo, se ha descubierto que este método presenta el inconveniente de que, en muchos casos, los portadores sensibilizados no se aglutinan por la reacción anticuerpo-antígeno, sino que lo hacen espontáneamente. Se considera que este fenómeno es debido a la propiedad de mútua adherencia del antígeno TP mismo. En consecuencia, este método basado en la reacción de hamaglutinación ha sido estudiado sólomente en un nivel experimental e incapaz de ser
25 desarrollado como un método práctico de prueba para la sífilis.

30 La finalidad principal de esta invención es la de acrecentar la sensibilidad y especificación y eliminar la aglu-



tación espontánea, mejorando el método convencional de prueba serológica basado en la hemaglutinación (aglutinación de portador). Esto se ha logrado al encontrar el modo de preparar el reagente para que los portadores sensibilizados de TP estén -
5 suspendidos en un medio especialmente preparado.

Los portadores (que, de ahora en adelante, serán llamados "portadores sensibilizados") tales como células sanguíneas rojas de origen animal o latex plástico mono-disperso (de ahora en adelante llamado "latex"), en los que son adsorbidos
10 los componentes celulares de *Treponema Pallidum* (que, a partir de ahora, se denominará "antígeno TP"), son suspendidos en un medio de suspensión en el que se disuelve sustancia salina regulada de fosfato (que, a partir de ahora, se denominará "SSRF") que contiene agente activo de superficie no-iónica, pasta y suero
15 de origen animal normal. La prueba de detección de la sífilis se lleva a cabo mezclando este medio con el suero a probar en un tubo de pruebas y leyendo a continuación los resultados a simple vista. Si se produce la aglutinación de los portadores sensibilizados, el suero sometido se considera como positivo, y si no se produce tal aglutinación, se considera que
20 el suero sometido es negativo. Se ha pensado ya en emplear, - como portador, células sanguíneas rojas de origen animal, por ejemplo, de ovejas. Sin embargo, el latex y otros son también considerados de utilidad como portadores. Cuando se usan células
25 sanguíneas rojas de origen animal como portador, deben ser previamente tratadas con formalina y ácido tánico antes de ser sensibilizadas con *Treponema Pallidum*. En cuanto a la preparación del antígeno, puede evitarse la espontánea aglutinación de los portadores sensibilizados y se produce la ligazón (aglu-
30 tinación) del antígeno TP (el portador sensibilizado) sólo con el anticuerpo contenido en las muestras de suero de prueba, -



5 pues la propiedad de mútua adherencia del antígeno TP mismo
es impedida por la acción del medio de suspensión, a modo de
cobertura, empleado en la preparación del antígeno. Además,
la reacción de aglutinación de los portadores sensibilizados
en el suero de reacción positiva se produce con bastante ra-
pidez, pues la liberación del antígeno TP de la superficie
de adsorción de los portadores es evitada por la acción de di-
cho medio de suspensión. Se considera mejor que el medio de
suspensión presente incluya aproximadamente un 0,25% de porta-
10 dor sensibilizado. Para observar si el suero a probar está
infectado o no de sífilis, se mezclan 0.55 ml. del medio de
suspensión presente, que incluye un 0.25% de portador sensibi-
lizado, con el suero a probar, cuya cantidad será equivalen-
te a una centésima del medio de suspensión. Cuando el portador
sensibilizado sea incluido en una proporción superior al 0.25%,
15 habrá de prepararse un medio de suspensión que no incluya por-
tador sensibilizado para diluir el medio de suspensión que in-
cluya portador sensibilizado al 0.25%.

20 El medio de suspensión consiste principalmente en
éster ácido graso de polioxietilenosorbitano y monoestearato
de glicerilo como agente activo de superficie no iónica; gomas
tales como goma arábiga y goma de tragacanto; pastas de algas
marinas, tales como agar-agar y ácido algínico; pastas anima-
les, tales como gelatina y cola; pastas sintéticas, tales como
25 alcohol de polivinilo y polivinilpirrolidona, y suero animal
como, por ejemplo, suero humano o suero de conejos. Estos adi-
tivos son disueltos en SSRF en cantidad adecuada de acuerdo
con los materiales dados. La cantidad normal se menciona en
los ejemplos que más adelante se describen. Ligeras fluctuacio-
30 nes en la cantidad no afectan al efecto del medio de suspen-
sión. Así, el método de la presente invención es el primero



que hace posible aplicar la reacción de aglutinación del portador a la serodiagnósis de sífilis en la práctica clínica. En efecto, los resultados obtenidos en un estudio comparativo representado en el cuadro que más adelante se incluye, ilustran perfectamente la superioridad en las altas especificación y sensibilidad del método de la presente invención, es decir, del método en que se emplea el TP mismo como antígeno, sobre cualquier otro método de prueba convencional. Si acaso los anticuerpos heterólogos contenidos en el suero a probar son absorbidos con polvo de testículos de conejos normales, TP no-patogénico de raza Reiter y célula roja insensibilizada homóloga en el caso de portador de célula roja, entonces el método de la presente invención mostrará una perfecta especificación. Se realizó un estudio comparativo entre las muestras de suero de prueba obtenidas de 100 pacientes sífilíticos y no sífilíticos, respectivamente, y ocho muestras de suero FPB. Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente cuadro:

ESTUDIO COMPARATIVO DE METODOS DE PRUEBA

METODO DE PRUEBA	METODO Cardio lipina		Prueba FCTP	Prueba ITP	Prueba ATF	PRUEBA CON ESTE REAGENTE INVENTADO						
						PORTADOR ERITROCITO		PORTADOR LATEX				
Lectura Suero	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
Suero sífilítico	2	98	2	98	3	97	3	97	0	100	1	99
Suero no sífilítico	80	20	96	4	100	0	95	5	98	2	98	2
							(100	0)	(100	0)		
Suero FPB	0	8	7	1	8	0	7	1	8	0	8	0

387961



8 -

5 La notable superioridad del método de la presente invención, con el uso de la preparación antigéna, sobre los métodos convencionales que usan el TP mismo como antígeno -ta les como la prueba ITP, la prueba FCTP y la prueba ATF- reside en que las técnicas para la reacción son mucho más simples y en que se puede realizar un gran número de pruebas con una pequeña cantidad de TP.

10 Así, por el método de la presente invención resulta posible la aplicación práctica de la prueba de serodiagnósis, usando TP como antígeno, a la prueba de rutina en que ha de manejarse una gran cantidad de muestras de suero. Lo cual, por el contrario, resultaba imposible con los métodos de prueba convencionales. Se ha descubierto que el número de muestras de suero que pueden ser experimentadas con la cantidad de TP obtenida de 20 conejos es de aproximadamente 600 en la prueba ITP, de alrededor de 2.000 en la prueba FCTP y de aproximadamente 50.000 en la prueba ATF respectivamente, pero con la preparación antigéna de la invención, el número es de alrededor de 200.000.

20 Procedimiento actualmente practicado.

(1).- (Antígeno TP).- Eritrocitos de oveja como portadores.

25 Se usaron 20 conejos machos cuyo peso oscilaba entre 2.5 y 3.0 kg. Alrededor de 10-10 células de TP fueron inoculadas en cada parénquima de testículo de los conejos. Cuando síntomas de testitis sifilítica aguda se manifestaron al cabo de entre 7 y 10 días después de la inoculación los conejos fueron matados mediante total desangramiento. A continuación, el parénquima de testículo fué recogido asépticamente de cada uno de los conejos, cada testículo fué cortado a través en entre 10 y 20 lonjas, y estas lonjas fueron remojadas
30 en una solución de cintrato de sodio de 0.075 M, a temperatura



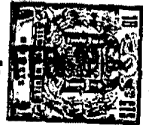
ambiente, de manera que el TP pudiese ser extraído. El extra-
to fué entonces sometido a fraccionamiento por precipitación
centrifuga a fin de eliminar los fragmentos de tejido y re-
coger el TP en el mayor estado de pureza posible. El TP así
5 recogido fué añadido a SSRF conteniendo 0.005% de albúmina
bovina, siendo la proporción de TP a la albúmina de 10 a 10
ml. y suspendiéndose al primero en la segunda. Esta suspensión
fué a continuación sometida a tratamiento sónico a 10 kc/s,
durante 30 minutos, para destruir las células de TP y la so-
lución así obtenida fué concentrada por pervaporación, en una
10 cámara frigorífica a 4-6 c, a 1/10 del volúmen original. A -
continuación, esta solución concentrada fué nuevamente some-
tida a concentración a la mitad del volúmen por una diálisis
a presión reducida en SSRF a un pH de 6.4 y, después de com-
pletarse la concentración, se añadió timerosal en proporción
15 de 1=5000.

(Portadores).

A una cantidad adecuada de solución de citrato de
sodio al 4% se añadió diez veces otro tanto de sangre recogi-
da asépticamente de la vena yugular de una oveja sana, se re-
20 cogieron los eritrocitos por separación centrifuga y se lava-
ron con una solución salina fisiológica. Los eritrocitos así
recogidos fueron fijados con solución salina fisiológica con-
teniendo un 3% de formalina y tratados con ácido tánico dilui-
do con SSRF entre 50,000 y 100.000 veces.
25

(Sensibilización).

Se efectuó la sensibilización mezclando 1 volúmen
de la suspensión de los eritrocitos así tratados en SSRF en
la proporción del 2.5% y 1 volúmen de solución antigéna TP
30 en SSRF en la concentración de 1=200, conservando esta mezcla



5 durante 30 minutos a 37°C para efectuar la adsorción de antígeno TP en la superficie de los portadores de eritrocito. A continuación, los eritrocitos portadores del antígeno TP por adsorción fueron recogidos por separación centrífuga, a razón de 1.500 r.p.m. durante 5 minutos, y lavados con 3 porciones de solución salina fisiológica conteniendo 0,5% de goma arábiga, por separación centrífuga, a fin de eliminar el exceso de antígeno TP.

(Medio de suspensión).

10 El medio de suspensión fué preparado mediante disolución en SSRF, en una concentración dada, de las sustancias siguientes:

Polisorbato 80	0.01%
Goma arábiga purificada	0.25%
Suero de conejo	1.00%

(Preparación antigénica).

15 Esta suspensión fué preparada mediante suspensión de los portadores sensibilizados, preparados por el método anteriormente descrito, en el medio de suspensión igualmente mencionado, en concentración de 0.25%. La suspensión así preparada constituye la preparación antigénica de la invención.

(2).- Portadores de látex.

20 Un volumen de la suspensión del látex en SSRF, en proporción de un 10%, y 1 volumen de solución antigénica TP en SSRF, en una concentración de 1=200, fueron mezclados y el antígeno TP fué sometido a adsorción en la superficie de portador de látex a 37°C durante 30 minutos. Esta mezcla fué sometida a separación centrífuga, a razón de 8.000 r.p.m. durante 10 minutos, para recoger los portadores de látex del antígeno TP por adsorción, y los portadores así recogidos, se lavaron con 3 porciones de solución salina fisiológica

30



conteniendo 0.5% de goma arábica por separación centrífuga, a fin de eliminar el exceso de antígeno TP. Las subsiguientes fases son las mismas descritas en el apartado (1) anterior.

N O T A

5

Descrito suficientemente el objeto de la presente Patente de Introducción, se declara que lo que constituye su - esencialidad y para lo que se pide la correspondiente protección es lo que se concreta en las siguientes reivindicaciones:

10

1ª.- Procedimiento para la obtención de una preparación antigénica para uso en la serodiagnósis de la sífilis, caracterizado por suspender eritrocitos de origen animal o látex plásticos mono-disperso, que son sensibilizados con componentes celulares de Treponema Pallidum por absorción, en sustancia salina regulada de fosfato conteniendo una pequeña cantidad de agente activo de superficie no iónica, pasta y suero normal de origen animal.

15

2ª.- Procedimiento para la obtención de una preparación antigénica para uso en la serodiagnósis de la sífilis.

20

Todo según se describe y reivindica en la presente Memoria descriptiva que consta de once hojas debidamente foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 4 de Febrero de 1.971

EL AGENTE:

P.P.

ME