

Int. Cl. C12K, A61K

PATENTE DE INVENCION

Case No. 24.741

431034

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN REACTIVO DE DIAGNOSTICO SECO.

=====

Solicitante: AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, residente en Berdan Avenue, Township of Wayne, Estado de New Jersey, EE.UU. de A.

=====

Esta invención se refiere a un procedimiento de obtención de un reactivo para diagnóstico en seco de mejor sensibilidad y susceptibilidad a la cuantificación para utilizar en el procedimiento fluorescente para la detección del factor anti-

nuclear (FAN) en la diagnosis del lupus erythematosus sistémico (LES) y otras enfermedades autoinmunes, compuesto por timocitos fetales de ternero especialmente preparados, fijados y estabilizados.

5 La combinación de características que distinguen la presente invención de la técnica anterior incluye: el uso de timo fetal de ternero como fuente de timocitos; el tamizado para aislar células individuales; la preparación de frotis de timocitos en portaobjetos de microscopios por secado al aire y fijación química; y portaobjetos de timocitos fijados y estabilizados preparados para su uso en un recipiente hermético al aire con un secante. El reactivo para diagnóstico 10 de la presente invención se fija (se seca químicamente) en el portaobjetos preparado para uso instantáneo en la detección del factor antinuclear y en la diagnosis de LES y otras enfermedades autoinmunes. Los productos de la referencia necesitan la preparación del protaobjetos.

15 El reactivo para diagnóstico de la presente invención puede ser utilizado por hospitales, laboratorios clínicos y por médicos como reactivo para diagnóstico, para ser utilizado en la prueba del factor antinuclear fluorescente para la detección y cuantificación de los factores séricos asociados con enfermedades autoinmunes tales como el lupus erythematosus (LES). Entre otras "enfermedades autoinmunes" 20 que pueden ser diagnosticadas con este reactivo se incluyen las enfermedades del tejido conjuntivo, la artritis reumatoide, la esclerodermia y la dermatomiositis. La invención que aquí se expone proporciona un reactivo para la prueba FAN fluorescente del lupus erythematosus, cómodo, fácil de utilizar, estable, muy sensible, y que se presta perfectamente a la normalización. 25

La invención se refiere a un procedimiento de obtención de un reactivo para diagnóstico en seco compuesto por timocitos fetales de ternero especialmente preparados, fijados y estabilizados para ser utilizados en la detección del factor antinuclear en el sue 30

ro humano, para la diagnosis del lupus erythematosus sistémico y otras enfermedades autoinmunes relacionadas, así como a un procedimiento para su uso en pruebas inmunofluorescentes para la detección del factor antinuclear en el suero humano en la diagnosis del lupus erythematosus sistémico y en otras enfermedades autoinmunes, y un equipo o paquete diagnóstico que contiene el citado reactivo para el mencionado uso.

La invención contempla un procedimiento para preparar un reactivo para diagnóstico en seco fijado en un portaobjetos de microscopio para la detección del factor antinuclear humano en el suero o en el plasma humano, en una prueba inmunofluorescente para la diagnosis del lupus erythematosus sistémico y otras enfermedades autoinmunes que comprende el tamizado de sólo el timo fetal de ternero para obtener del mismo células timocitos dispersas; suspender dichas células timocitos dispersas en solución salina tamponada e isotónica hasta un recuento de células de aproximadamente $1,0-1,5 \times 10^6$ células/ml; colocar al menos una porción de aproximadamente 0,05 ml. de dicha suspensión de células timocitos dispersados en un portaobjetos de microscopio; secar la citada cantidad de la suspensión de timocitos dispersados en el portaobjetos; fijar la suspensión de células secas con solución modificada de Carnoy; lavar la suspensión fijada con agua y secar la suspensión fijada y lavada.

La invención contempla igualmente un reactivo para diagnóstico en seco fijado a un portaobjetos del microscopio para la detección del factor antinuclear humano en el suero o plasma humano en una prueba inmunofluorescente para la diagnosis del lupus erythematosus sistémico y otras enfermedades autoinmunes comprendiendo el reactivo para diagnóstico en seco preparado por el procedimiento que aquí se revela.

La invención contempla además el perfeccionamiento

to en la detección del factor antinuclear humano en el suero o plasma humano en pruebas inmufluorescentes para la diagnosis del lupus erythematosus sistémico y otras enfermedades autoinmunes, que incluye el empleo del reactivo para diagnóstico en seco preparado según aquí se expresa.

5

La invención contempla igualmente un equipo diagnóstico para ser utilizado en la detección del factor antinuclear humano en el suero o plasma humano en una prueba inmufluorescente para la diagnosis del lupus erythematosus sistémico y otras enfermedades autoinmunes, formado fundamentalmente por quince portaobjetos de microscopio cada uno de los cuales contienen tres frotos estabilizados de timocitos fetales de ternero, preparados por el procedimiento que aquí se revela; un vial de suero de control positivo del lupus erythematosus sistémico obtenido de donadores LES; y un vial de suero de control negativo de lupus erythematosus sistémico obtenido de donadores no LES, y un vial de globulina antihumana y liofilizada de conejo, conjugada con fluoresceína. El conjugado consiste en anticuerpo de conejo dirigido contra gammaglobulina humana. El anticuerpo de conejo se aísla del suero de conejos hiperinmunizados con gammaglobulina humana. El anticuerpo de conejos purificados se mezcla con isotiocinato de fluoresceína, se vuelve a purificar y se liofiliza.

10

15

20

La invención se refiere además a un procedimiento para la detección del factor antinuclear humano en suero humano utilizando una prueba inmufluorescente para la diagnosis del lupus erythematosus sistémico y otras enfermedades autoinmunes que comprende colocar alrededor de 0,03 ml. de suero humano diluido en unos 0,05 ml. de un frote de timocitos fetales secos de ternero en un portaobjetos de microscopio preparado según aquí se indica; colocar alrededor de 0,03 ml. de cada suero de control de lupus erythematosus sistémico positivo y negativo en una segunda y tercera cantidad de

25

30

0,05 ml. de frotos de timocitos fetales secos de ternero en dicho portaobjetos; incubar el citado portaobjetos; enjuagar el portaobjetos incubado; lavar el portaobjetos enjuagado; añadir alrededor de 0,03 ml. de conjugado de fluoresceína globulina antihumana diluida de conejo a cada frote; extender uniformemente dicho conjugado para cubrir todo el frote; repetir los pasos de incubar, enjuagar, lavar, añadir y extender -- anteriormente indicados; montar dichos portaobjetos; y examinar los -- portaobjetos bajo microscopio fluorescente utilizando un aumento de -- 100X (objetivo de potencia menor) y un aumento de 440X (objetivo de -- potencia mayor en seco).

El reactivo para diagnóstico de la presente invención se hace únicamente con timocitos fetales de ternero. No se utilizan ni se plantea la posibilidad de utilizar otros timocitos. Los timocitos son linfoblastos de la glándula timo que contienen núcleos muy -- grandes. A medida que crece el ternero el timo se hace menor. Por consiguiente, los timos retirados de fetos de ternero se encuentran en su fase mayor de desarrollo y por lo tanto son más ricos en timocitos que contienen DNP.

En la práctica de la invención, se recogen y guardan en solución salina fisiológica a 4 ° C hasta que se utilicen timos fetales de ternero de fetos de terneros de cinco a seis meses. Los timocitos fetales de ternero se obtienen del timo fetal fresco de ternero tamizado. El tamizado es una parte muy importante de la presente invención ya que aísla los timocitos individuales y los dispersa para normalización del recuento de las células de los frotos. La dispersión de los timocitos elimina el amontonamiento y mejora la visualización e -- interpretación de la prueba. En la fase de tamizado los timos fetales se agitan a través de un tamiz metálico de una exprimidora de amnios o similar. De esta manera se aíslan y dispersan las células de forma muy eficiente y práctica. Las células dispersadas se suspenden enton-

ces en una solución salina isotónica tamponada hasta un recuento de -
células de aproximadamente $1,0-1,5 \times 10^6$ células/ml. Esta suspensión
impide la rotura de los timócitos. Se realiza un recuento de células -
porque debe haber suficientes células como para que se localicen fácil-
5 mente bajo un microscopio, pero no tantas que las células se arraci-
men o amontonen entre sí formando masas. A continuación se coloca
una gota (alrededor de 0,05 ml.) de la suspensión de células contadas,
en uno o varios círculos, sobre el portaobjetos de un microscopio, ge-
neralmente tres círculos por portaobjetos, y se seca. La suspensión
10 de células puede secarse en el portaobjetos a la temperatura ambien-
te o bien a unos 37 ° C con baja humedad. El portaobjetos con timo-
citos se fija o estabiliza entonces en solución modificada de Carnoy --
(75 % en metanol absoluto : 25 % de ácido acético glacial), se lava
con agua, se seca al aire y se guarda en un recipiente hermético al -
15 aire con secante, o bien se congela a -20 ° C. o menos, preparada -
para su uso en una prueba de factor antinuclear fluorescente.

El portaobjetos del microscopio se fija con solu-
ción de Carnoy modificada para impedir la descomposición de los ti-
mócitos. La solución de Carnoy modificada actúa como preservativo y
20 estabilizador que impide la rotura de las células e impide al mismo -
tiempo que las células se separen del portaobjetos. Sin solución de --
Carnoy no hay estabilidad. Otras soluciones de fijación provocan fluo-
rescencia no específica, pérdida de integridad de las células o pérdida
de la fluorescencia específica. El portaobjetos se lava en agua destila-
da y se seca al aire a la temperatura ambiente para retirar el exceso
25 de solución de Carnoy. Después de secado, los portaobjetos se colocan
en un recipiente hermético al aire con un secante para impedir la de-
gradación de los timócitos.

Para realizar la prueba del factor antinuclear - -
30 fluorescente utilizando el reactivo diagnóstico de la presente invención

5 el suero del paciente se incuba con los frotos de timocitos en el portaobjetos de manera que los anticuerpos del DNP, si los hay, puedan reaccionar con el DNP en los núcleos del timo y fijarse a ellos. Los componentes no fijados del suero se lavan entonces con diversos enjuagues. La reacción se visualiza acto seguido añadiendo anticuerpo animal a gammaglobulina humana que ha sido conjugada con una molécula que emite fluorescencia, como por ejemplo el isotiocianato de fluoresceína. Después de un lavado más para retirar la fluorescencia no específica se examina el portaobjetos en un microscopio equipado con 10 iluminación y filtros para expresar la fluorescencia; si el suero es positivo, se observará en los núcleos del timo el complejo anticuerpo -- DNP : DNP : antiglobulina humana.

La invención se ilustrará más completamente con referencia a la descripción detallada que sigue:

15 Ejemplo 1.

Procedimiento para la Preparación de 2.000 portaobjetos conteniendo reactivo para diagnóstico preparado para su uso.

A. Materiales

Solución modificada de Carnoy.

20 Metanol absoluto 75 %
Acido acético glacial 25 %

Solución salina tamponada con fosfato (OBS), 0,05 M, pH 7,1 ± 0,1

25 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,93 g.
 Na_2HPO_4 5,11 g. A.S. H_2O hasta un litro.
NaCl 5,70 g.

Portaobjetos Reich (Bellco Glass)

Soportes y discos de coloración

Exprimidor de amnios.

30 Timo fetal (de un feto de 5 a 6 meses) recogido y proporcionado en solución fisiológica salina a 4 ° C.

B. Preparación de la suspensión de timocitos fetales de ternero.

1. Retirar una porción de 10 g. del timó fetal y enjuagar en PBS. (Solución salina tamponada con fosfato).
- 5 2. Exprimir los 10 g. a través del exprimidor de amnios en un matraz de 500 ml. que contenga 250 ml. de PBS. Enjuagar el exprimidor con 250 ml. de PBS llevando el volumen final hasta 500 ml.
- 10 3. Pasar la suspensión de 500 ml. a través de seis (6) capas de gasa, acto seguido centrifugar a 170 x g. (IEC-PR6, Cabeza - nº. 259, 800 r.p.m.) durante 798 minutos en cuatro frascos de centrífuga de 250 ml.
- 15 4. Retirar cuidadosamente el sobrenadante y pasarlo a través de un filtro de vidrio sinterizado de poros 'c'.
5. Efectuar un recuento de células con azul de tripan y ajustar la suspensión a 1×10^6 células/ml.

C. Preparación de los portaobjetos de timocitos fetales de ternero.

1. Colocar una gota (aproximadamente 0,05 ml.) de la suspensión diluida de células en el centro de cada anillo de cerámica de portaobjetos Reich.
- 20 2. Secar la suspensión en el portaobjetos con ayuda de aire caliente.
3. Cuando el frotis está seco colocar el portaobjetos sobre el borde en el soporte para coloración-no colocar los portaobjetos uno encima del otro.
- 25 4. Introducir el soporte en solución fresca modificada de Carnoy - durante 10 minutos.

5. Enjuagar los portaobjetos en PBS y lavarlos introduciéndolos en PBS durante diez minutos. Utilizar un baño separado para el enjuague y el lavado.
6. Eliminar la sal introduciendo los portaobjetos en tres baños consecutivos de agua destilada.
7. Drenar y secar los portaobjetos.
8. Embalar inmediatamente, un paquete desecante y 15 portaobjetos por recipiente.

Ejemplo 2.

Procedimiento de prueba para portaobjetos preparados conteniendo reactivo para diagnóstico.

A. Materiales

Solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2 ± 0,1.

Fórmula por litro:

NaCl	7,65 g
Na ₂ HPO ₄	0,724 g.
KH ₂ PO ₄	0,21 g.

Pueden prepararse varios litros y guardarse a la temperatura ambiente. Determinar el pH de cada lote de PBS. Si el pH es superior o inferior al valor de 7,2 ± 0,1, ajustar con NaOH normal o HCl.

Medio para el montaje

Una parte de PBS, con 7,2 pH, más 9 partes de glicerina (calidad para reactivos).

Microscopios adaptados para microscopia fluorescente. Para uso de rutina será suficiente con una fuente ultravioleta -

tal como una lámpara de mercurio a alta presión HBO 200 W en combinación con un filtro de excitación BG12 y un filtro de barrera OGI.

B. Procedimiento.

5

1. Las muestras de sangre deben recogerse asépticamente, evitando la hemólisis, dejando que se coagulen. El suero debe retirarse y refrigerarse o congelarse si no se prueba inmediatamente. No calentar sueros o controles inactivos,

10

2. Reconstituir la antiglobulina humana liofilizada con 1 ml. de agua destilada.

15

3. La antiglobulina humana reconstituida con solución salina tamporada con fosfato (PBS). Se ha determinado previamente la concentración óptima para cada lote de conjugado. Dado que las condiciones y el equipo varían de un laboratorio a otro, puede ser conveniente determinar el factor de dilución para cada lote de antiglobulina humana probándolo con sueros standards de control. La solución seleccionada es óptima cuando se obtiene la fluorescencia máxima con el suero de control positivo y la fluorescencia mínima con el suero de control negativo.

20

4. Preparar una dilución 1 : 10 del suero del paciente en PBS. --
Nota: Los controles positivos y negativos deben utilizarse simultáneamente con cada prueba. No diluir los sueros de control.

25

5. Añadir aproximadamente 0,03 ml. de suero diluido del paciente al primer círculo del portaobjetos de microscopio con timocitos. Añadir igualmente 0,03 ml. de suero de control AN-F de lobo positivo y negativo a los círculos segundo y tercero. Llevar cuidado de que no rebose ni se mezclen los sueros.

6. Incubar el portaobjetos durante 30 minutos a la temperatura ambiente en una atmósfera húmeda para impedir la evaporación.

7. Enjuagar los portaobjetos PBS colocando los portaobjetos duran-

te cinco minutos en un disco de coloración conteniendo PBS. -- Agitar los portaobjetos introduciéndolos y sacándolos de la solución salina tamponada con fosfato.

8. Utilizando PBS fresca, repetir el procedimiento de lavado.

5 9. Retirar los portaobjetos del agua, escurrir el exceso de fluido de los portaobjetos y secar la periferia con papel secante.

10. Añadir aproximadamente 0,03 ml. del conjugado diluido a cada frotis de los círculos. Extender uniformemente con un aplica-- dor para cubrir todo el frotis.

10 11. Repetir los pasos 6, 7, 8, 9 y 10.

12. Montar los portaobjetos inmediatamente colocando una pequeña gota de medio de montaje en cada frotis y aplicar un cristal - de tapa de 24 x 50 mm.

15 13. Examinar lo antes posible los portaobjetos. Si se necesita un - retraso en la lectura, colocar los portaobjetos en la oscuridad a 4 ° C y leer en un plazo máximo de cuatro horas.

14. Examinar los frotis con microscopio fluorescente utilizando un aumento de 100 X (objeto de menor potencia) y 450 X (objetivo de gran potencia seco).

20 Ejemplo 3.

Procedimiento de prueba para portaobjetos prepara-- rados conteniendo reactivo para diagnóstico utilizando el Equipo Diagnós-- tico.

25 Como se indica en la presente memoria, la inven-- ción hace también referencia a un equipo diagnóstico para la detección del factor antinuclear humano comprendiendo portaobjetos de timocitos fetales de ternero preparados según la invención. Este equipo diagnos--

15 portaobjetos de microscopio de tres anillos con frotis estab-
lizados de timocitos fetales de ternero.

1 vial para estrujar de 1 ml. de suero de control positivo AN-
F (humano).

5 1 vial para estrujar de 1 ml. de suero de control negativo AN-
F (humano).

1 vial de 1 ml. de antiglobulina humana de conejo, conjugada -
con fluoresceína y liofilizada.

10 Equipo de laboratorio y materiales que se necesi-
tan y que no se proporcionan en el equipo.

1. Microscopio de fluorescencia.
2. Cristales de tapa (24 x 50 mm)
3. Discos para coloración y soportes.
4. Papel secante.
- 15 5. Pipetas Pasteur (con una capacidad de aproximadamente 0,03
ml.).
6. Tubos de ensayo serológico.
7. Solución salina tamponada con fosfato (PBS). Véase fórmula.
8. Glicerol (calidad reactiva). Véase fórmula pra los medios de
20 montaje.

Microscopia fluorescente.

25 La mayoría de los microscopios puede adaptarse
para la microscopia fluorescente. Para las pruebas AN-F se ha reco-
mendado cualquiera de las siguientes combinaciones de lámpara, fil-
tro y condensador.

Combinaciones de lámpara y filtro para las prue-
bas AN-F fluorescente.

- 1.- Lámpara HBO 200
Filtro de calor BG-22

Filtro excitador BG-12 (702) (3-4 mm. de espesor);
Filtro pantalla OG-1 (724) (anaranjado).
Condensador de campo oscuro.

2.- Lámpara HBO 200

5

Filtro de calor BG-22
Filtro excitador BG-38
Filtro excitador BG-12 (702) (3-4 mm. de espesor)
Filtro de pantalla OG-1 (724) (anaranjado)
Condensador de campo brillante.

10

3.- Lámpara HBO 200

Filtro de calor BG-22
Filtro excitador UG-1 (2 o 4 mm. de espesor)
Filtro de pantalla OG-1 (724) (anaranjado)
Condensador de campo oscuro.

15

4.- Lámpara HBO 200

Filtro de calor BG-22
Filtro excitador BG-38
Filtro de pantalla OG-1 (724) (anaranjado)
Filtro excitador UG-1 (2 o 4 mm. de espesor)
Condensador de campo brillante.

20

5.- Lámpara HBO 200

Filtro de calor BG-22
Filtro excitador BG-12 (702) (3-4 mm. de espesor)
Filtro excitador Corning 5840 (693) (2 mm. de espesor)
Filtro de pantalla BG-9 (723)
Condensador de campo oscuro o de campo brillante.

25

6.- Lámpara de yoduro de cuarzo

Filtro excitador BG-12 (702)
Filtro excitador Corning 5113 (695)
Filtro pantalla

30

Condensador de campo brillante

7.- Lámpara de filamento de wolframio de 6 o 12 V al ajuste máximo de la tensión (reostato)

Filtro excitador BG-12 (702) (4 mm. de espesor)

5

Filtro pantalla o filtro Kodak n. 15 o 16 OG-1 (724), una lámina de gelatina colocada antes del ocular.

Condensador de campo brillante.

Instrucciones para el uso del equipo.

Muestra.

10

1. Las muestras de sangre deben recogerse asépticamente, evitando la hemólisis, y dejar que se coagulen. El suero debe retirarse y refrigerarse o congelarse si no se prueba inmediatamente.

2. No calentar sueros inactivos o controles.

15

Procedimiento.

1. Reconstituir la antiglobulina humana liofilizada con 1 ml. de agua destilada.

2. Diluir la antiglobulina humana reconstituida con salina tamponada con fosfato (PBS).

20

Salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,1 ± 0,1

NaCl 5,7 gramos

Na₂HPO₄ 5,11 gramos

NaH₂PO₄·H₂O 1,93 gramos

Agua destilada 1000 ml.

25

Pueden prepararse varios litros y almacenarse a 4 ° C. Determinar el pH de cada lote de PBS. Si el pH es superior

o inferior a $7,1 \pm 0,1$, ajustar con NaOH normal o HCl. La concentración óptima para cada lote de conjugado ha sido predeterminada y se indica en la etiqueta. Distribuir el conjugado diluido en pequeñas cantidades y guardar congelado. Las condiciones y el equipo pueden variar de un laboratorio a otro, puede ser conveniente determinar la dilución óptima de trabajo para cada lote de antiglobulina humana. Esto se realiza probando diluciones de serie de la antiglobulina humana en PBS -- contra los sueros de control positivos y negativos AN-F. La dilución -- óptima de trabajo es la dilución que proporciona la fluorescencia máxima con el suero de control positivo y la fluorescencia mínima con el suero de control negativo. El conjugado reconstituido y diluido no debe dejarse a la temperatura ambiente ni exponerse a la luz durante períodos prolongados. Evitar la congelación y descongelación repetidas.

3.- Preparar una dilución de 1 : 10 del suero del paciente en PBS, Nota: Los controles positivos y negativos deben realizarse simultáneamente con cada prueba. No diluir los sueros de control.

4.- Añadir una gota (aproximadamente 0,03 ml) - de suero diluido del paciente al primer círculo del portaobjetos del microscopio AN-F. Añadir igualmente una gota de sueros de control positivo y negativo AN-F a los círculos segundo y tercero. Debe llevarse cuidado de que no rebosen ni se mezclen los sueros. Si es necesario, puede crearse un pozo más profundo marcando la periferia de cada -- círculo con un lápiz de cera blanda.

5.- Incubar los portaobjetos durante 30 minutos a la temperatura ambiente en una atmósfera húmeda para impedir la evaporación.

6. Enjuagar los portaobjetos en PBS colocándolos en un disco de soporte conteniendo PBS durante cinco minutos. Agitar los portaobjetos sumergiéndolos y sacándolos de la PBS.

7. Utilizando PBS fresca, repetir dos veces el procedimiento de enjuague (tiempo total de enjuague = 15 minutos).

5 8. Retirar los portaobjetos del tambor, escurrir el exceso de fluido de los portaobjetos, y secar la periferia con papel secante.

9. Añadir una gota (aproximadamente 0,03 ml.) de conjugado diluido a cada círculo; efectuar un frote y extender uniformemente con un aplicador para cubrir todo el frotis.

10. Repetir todos los pasos 5, 6, 7 y 8.

10 11. Montar inmediatamente los portaobjetos colocando una pequeña gota de medio de montaje en cada frotis y aplicar un cristal de tapa de 24 x 50 mm.

Medio de montaje.

15 Una parte de PBS, con pH de 7,1, más 9 partes de glicerol (calidad reactiva).

12. Examinar los portaobjetos lo antes posible. Si se necesita un retraso en la lectura, colocar los portaobjetos en la oscuridad a 4 ° C y leer en un plazo de cuatro horas.

20 13. Examinar los frotis con microscopio fluorescente utilizando un aumento de 100X (objetivo de menor potencia) y un aumento de 440X (objetivo seco de mayor potencia).

Interpretación.

25 1. Los sueros LE positivos pueden mostrar varios modelos de fluorescencia. Los más comunes son la coloración nuclear homogénea o difusa y la coloración nuclear periférica o velluda. Esta última se observa generalmente en sueros fuertemente reactivos.

2. El grado de fluorescencia se calcula a ojo y el brillo, cuando se compara con los controles negativos y positivos, se registra en una simple escala tal como la indicada a continuación:

- 5
- negativo (incluyendo + y trazas)
 - + fluorescencia justamente visible.
 - + + fluorescencia definida
 - + + + fluorescencia brillante

10

3. Los pacientes con artritis reumatoide, dermatomiositis, esclerodermia, y una serie de enfermedades del tejido conjuntivo pueden ser AN-F positivos generalmente en bajas concentraciones y baja frecuencia. La prueba inicial a una dilución de 1 : 10 evitará un gran número de reacciones no específicas y proporcionará un nivel significativo de la sensibilidad y especificidad de la prueba.

15

4. Se recomienda que se vuelvan a probar y titular los pacientes con prueba AN-F positiva al nivel 1 : 10. Las reacciones fuertemente positivas con contenido de AN-F superiores a 1 : 80 - 1:1:160 se observan con frecuencia en pacientes con LES clínicamente identificable. Los contenidos AN-F elevados sugieren, por consiguiente, LES y pueden correlacionarse con la actividad de la enfermedad.

20

Nota: una prueba AN-F fuertemente positiva no confirma la diagnosis de LES. Se necesitan resultados adicionales de las pruebas clínicas y de laboratorio para la prognosis y el tratamiento de los pacientes del LES.

25

5. Una prueba AN-F negativa de suero de 1 : 10 excluye virtualmente una diagnosis de LES ya que la prueba AN-F fluorescente es positiva en más del 99 % de pacientes con LES. No obstante, puede ser conveniente repetir de nuevo la prueba, con una nueva muestra, de 7 a 10 días más tarde, especialmente con pacientes que pueden encontrarse en las primeras fases de la enfermedad, en remisión, o que reciben terapia con esteroides.

30

Ejemplo 4.

Evaluación clínica y de laboratorio del reactivo de factor antinuclear fluorescente en la diagnosis del lupus erythematosus sistémico.

5 El reactivo de factor antinuclear fluorescente de la presente invención ha sido sometido a evaluación clínica y de laboratorio.

Pacientes.

10 Esta evaluación se llevó a cabo en los sueros de 145 sujetos incluyendo 22 con lupus erythematosus sistémico clínicamente activo, 21 con lupus erythematosus sistémico clínicamente inactivo, 6 con enfermedades del tejido conjuntivo, y 96 de control (incluyendo normales, controles del hospital y otros estados de enfermedad según se indica en la Tabla II).

15 Pruebas de laboratorio.

Se efectuaron comparaciones con estos 145 sujetos con las siguientes preparaciones: (1) prueba standard con la preparación de células LE (Prueba A); (2) una prueba con reactivo DNP-latex (Prueba B); (3) la prueba del factor antinuclear fluorescente de la presente invención (100 sujetos); y (4) otra prueba de factor antinuclear (Prueba C).

20 En las Tablas I y II se presentan los resultados. Además, en la Tabla III se dan los datos de valoración para la prueba de factor antinuclear fluorescente de la presente invención y la prueba del reactivo DNP-latex.

25

Resultados de laboratorio.

Se obtuvo un acuerdo excelente durante todo el tiempo entre la prueba de reactivo DNP-latex (Prueba B y la Prueba A:

82 % contra 86 % positivo para casos clínicamente activos, 19 % contra 19 % para casos clínicamente inactivos, 100 % contra 83 % negativo para casos de enfermedades del tejido conjuntivo (reflejando una especificidad algo mayor para la prueba de reactivo DNP-latex y 99 % contra 99 % negativo para los sujetos de control. La prueba C más sensible y la prueba de factor antinuclear fluorescente de la invención mostraron una mayor especificidad para la preparación de la presente invención que para la preparación de la prueba C: 89 % contra 82 % positivo para casos clínicamente activos, 58 % contra 71 % positivos para casos clínicamente inactivos, 67 % contra 50 % negativos para casos de enfermedades del tejido conjuntivo, y 100 % contra 94 % negativo para los sujetos de control. Tanto la prueba C como la de la presente invención mostraron una mayor reactividad y menos especificidad que la prueba con reactivo DNP-latex (Prueba B) y la Prueba A.

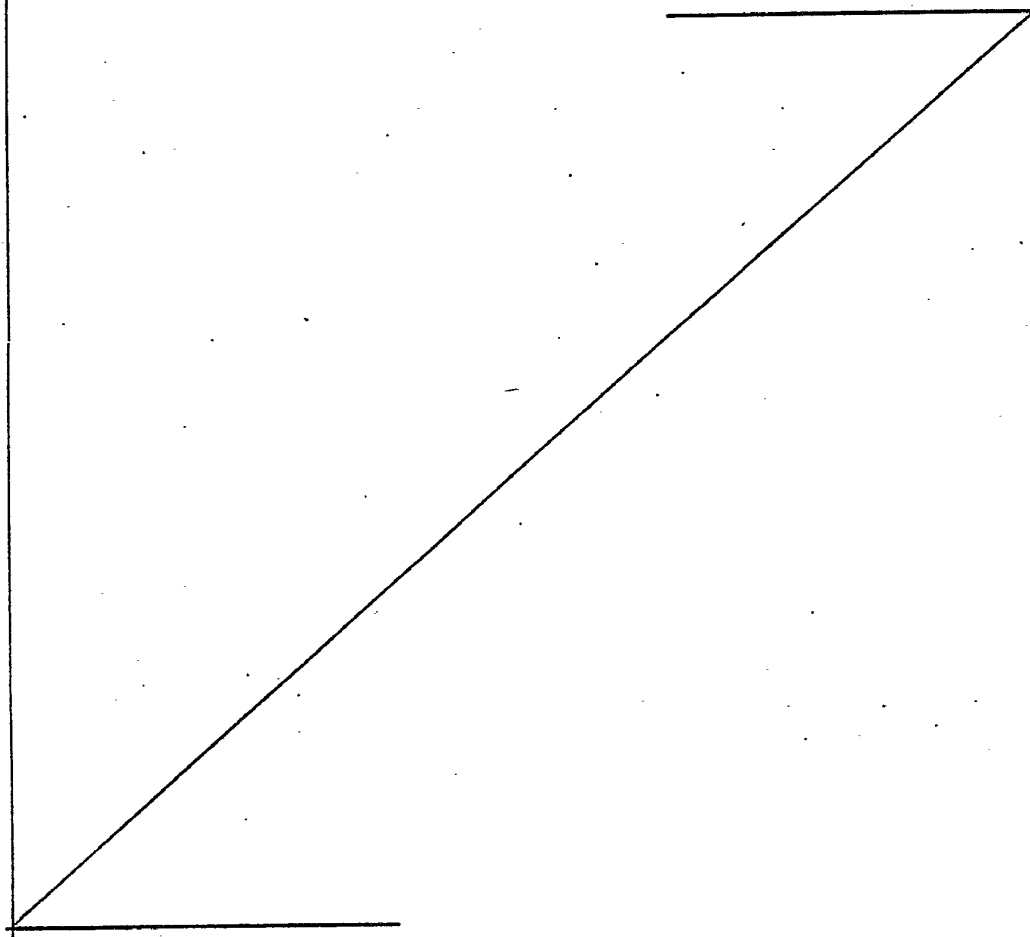


TABLA I

Resumen de la evaluación de las Pruebas de factor Antinuclear fluorescente y la prueba

Estado de la enfermedad	Reactores	
	Preparado	Célula LE Prueba Prueba A
Lupus erythematosus clínicamente activo	19/22	(86 %)
Lupus erythematosus clínicamente inactivo	4/21	(19%)
Enfermedad del tejido conjuntivo	1/6	(17%)
Controles *	1*/96	(1 %)
Totales	25/145	(17 %)

DNP-Latex en la diagnosis de Laboratorio de Lupus Erythematosus Sistémico. -

positivos	Factor antinuclear fluores- cente Prueba de la invención.		
	Prueba B	Prueba C	Prueba de la invención.
18/22	(82%)	18/22 (82 %)	17/19 (89 %)
4/21	(19 %)	15/21 (71 %)	11/19 (58 %)
0/6	(0 %)	3/6 (50 %)	2/6 (33 %)
1*/96	(1 %)	6/96 (6 %)	0/56 (0 %)
23/145	(16 %)	42/145 (29 %)	30/100 (30 %)

* Sueros de control normales y de hospital y otros estados de enfermedad según la Tabla

* Reactores de LES inducido por la procainamida.

TABLA I

Resumen de la evaluación de las Pruebas de factor Antinuclear fluorescente y la prueba

Estado de la enfermedad	Reactores	
	Preparado	Célula LE Prueba Prueba A
Lupus erythematosus clínicamente activo	19/22	(86 %)
Lupus erythematosus clínicamente inactivo	4/21	(19%)
Enfermedad del tejido conjuntivo	1/6	(17%)
Controles ⁺	1 [*] /96	(1 %)
Totales	25/145	(17 %)

* Sueros de control normales y de hospital y otros estados de enfermedad según la Tabla

^{*} Síndrome de LES inducido por la procainamida.

aba

DNP-Latex en la diagnosis de Laboratorio de Lupus Erythematosus Sistémico.-

positivos					
Prueba B		Prueba C		Factor antinuclear fluorescente Prueba de la invención.	
18/22	(82%)	18/22	(82 %)	17/19	(89 %)
4/21	(19 %)	15/21	(71 %)	11/19	(58 %)
0/6	(0 %)	3/6	(50 %)	2/6	(33 %)
1*/96	(1 %)	6/96	(6 %)	0/56	(0 %)
23/145	(16 %)	42/145	(29 %)	30/100	(30 %)

tbla

TABLA II

Evaluación de las pruebas de factor nuclear fluorescente y la prueba de tosus sistémico.

reactivo DNP-Latex en la Diagnósis de Laboratorio del Lupus Erythema-

Diagnósis	Nº. de sueros probados.	Prueba con preparado de células LE		Pruebas AN-F Fluorescente				Prueba B.	
		Prueba A		Prueba de la invención	Prueba C.		Prueba B.		
		Pos.	Neg.		Pos.*	Neg.			Pos.
LES (Clínicamente activo).	22								
LES (Clínicamente inactivo)	21	4	17			17/19 ^c	2	18	4
Enfermedad del tejido conjuntivo:									
Poliartritis	2	1	1			1	1		2
Artritis reumatoide	2		2				2		2
Esclerodermia	2		2			1	1		2
Otros estados morbosos:									
Anemias	6		6				6		6
Septicemia	1		1				1		1
Arritmia cardíaca	1	1					1	1	
Colecistitis	1		1				1		1
Discrasia (Células del plasma)	1		1				1		1
Mononucleosis infecciosa	1		1				1		1
Mieloma múltiple	1		1				1		1

TABLA II

Evaluación de las pruebas de factor nuclear fluorescente y la prueba de
tosus sistémico.

Diagnosis	Nº. de sueros probados.	Prueba con preparado de células LE	
		Prueba A	
		Pos.	Neg.
LES (Clínicamente activo).	22		
LES (Clínicamente inactivo)	21	4	17
Enfermedad del tejido conjuntivo:			
Poliartritis	2	1	1
Artritis reumatoide	2		2
Esclerodermia	2		2
Otros estados morbosos:			
Anemias	6		6
Septicemia Candida	1		1
Arritmia cardíaca ^b	1	1	
Colecistitis	1		1
Discrasia (Células del plasma)	1		1
Mononucleosis infecciosa	1		1
Mieloma múltiple	1		1

le reactivo DNP-Latex en la Diagnósis de Laboratorio del Lupus Erythema-

Pruebas AN-F Fluorescente					
Prueba C.		Prueba de la invención		Prueba B.	
Pos.*	Neg.	Pos.*	Neg.	Pos.	Neg.
18	4	17/19 ^c	2	18	4
15	6	11/19 ^d	8	4	17
1	1	1	1		2
	2		2		2
2		1	1		2
	6		6		6
	1		1		1
1			1	1	
1			1		1
	1		1		1
	1		1		1
	1		1		1

TABLA II (Continuación)

Diagnosis	Nº. de sueros probados.	Prueba con preparado de células LE Prueba A.		Pruebas AN-F Fluorescente Prueba de la invención				Prueba B.	
		Pos.	Neg.	Pos.*	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Mielofibrosis	1		1		1				1
Enfermedad cardiaca reumática	1		1		1				1
Tromboflebitis	2		2		2				2
Controles normales y de hospital	80		80		76		40		80
Totales	145	25	120	42	103	30	70	23	122

* Los criterios para una prueba de factor antinuclear fluorescente positivo es el de sueros positivos a una dilución de 1 : 10 o mayor.

a Lupus erythematosus sistémico clínicamente inactivo que responda a los criterios de Siegel et al. (sin fiebre, artritis activa, u otras manifestaciones inflamatorias agudadas).

Síndrome de LES inducido por procainamida.

c Tres sueros no probados.

d Dos sueros no probados.

TABLA II (Continuación)

Diagnosia	Nº. de sueros probados.	Prueba con preparado de células LE Prueba A.	
		Pos.	Neg.
Mielofibrosis	1		1
Enfermedad cardiaca reumática	1		1
Tromboflebitis	2		2
Controles normales y de hospital	80		80
Totales	145	25	120

* Los criterios para una prueba de factor antinuclear fluorescente positivo es el de sueros

^a Lupus erythematosus sistémico clínicamente inactivo que responda a los criterios de Sieg

^b Síndrome de LES inducido por procainamida.

^c Tres sueros no probados.

^d Dos sueros no probados.

le

Pruebas AN-F Fluorescente					
Prueba C.		Prueba de la invención		Pruba B:	
Pos. *	Neg.	Pos. *-	Neg.	Pos.	Neg.
	1		1		1
	1		1		1
	2		2		2
4	76		40		80
42	103	30	70	23	122

ueros

positivos a una dilución de 1 : 10 o mayor.

e Sieg

el et al. (sin fiebre, artritis activa, u otras manifestaciones inflamatorias agudas).

TABLA III

Resumen de los contenidos de anticuerpos del suero de LES obtenido con DNP-Latex

Diagnos	Nº. de sueros probados.	Prueba DNP-Latex del LES Contenidos del suero 1:1-1:10 20-80 160-320 320
LES clínicamente activo	22	3 6 5 4
LES clínicamente inactivo	21	3 0 0 1
Control del tejido conjuntivo	6	0 0 0 0
Sueros de control normales y de estados fital y otros estados morbosos enumerados en la Tabla II	96	*1 0 0 0

la prueba de factor antinuclear fluorescente de la invención y prueba reactiva

Nº. de sueros probados.	Prueba AN-F Fluorescente de la invención Contenidos del suero 1:1-1:10 20-80 160-320 320
19	0 3 5 9
19	3 1 5 2
6	2 0 0 0
56	0 0 0 0

* Síndrome LES inducido por procainamida.

TABLA III

Resumen de los contenidos de anticuerpos del suero de LES obtenido con
DNP-Latex

Diagnosis	Nº. de sueros probados.	Prueba DNP-Latex del LES Contenidos del suero			
		1:1-1:10	20-80	160-320	320
LES clínicamente activo	22	3	6	5	4
LES clínicamente inactivo	21	3	0	0	1
Control del tejido conjuntivo	6	0	0	0	0
Sueros de control normales y de hospital y otros estados morbosos enumerados en la Tabla II	96	*1	0	0	0

* Síndrome LES inducido por procainamida.

la prueba de factor antinuclear fluorescente de la invención y prueba reactiva

Nº. de sueros probados.	Prueba AN-F Fluorescente de la invención Contenidos del suero			
	1:1-1:10	20-80	160-320	320
19	0	3	5	9
19	3	1	5	2
6	2	0	0	0
56	0	0	0	0

N O T A

5 Descrita suficientemente la naturaleza del inven-
to, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse --
constar, que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles
de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio funda-
mental; también se hace constar que el invento se refiere a una Solici-
tud de Patente presentada en Norteamérica, con fecha 15 de octubre -
de 1.973, Nº. Ser 406.439; acogiéndose por lo tanto a los beneficios -
que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que -
10 constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Pa-
tente de Invención por 20 años en España, sobre: Procedimiento para
preparar un reactivo de diagnóstico seco; caracterizándose por lo si--
guiente:

15 1.- Procedimiento para preparar un reactivo de
diagnóstico seco, fijado sobre una platina de microscopio para la de--
tección del factor antinuclear humano en suero o plasma humano, en
su ensayo inmunofluorescente para la diagnosis de lupus eritematoso -
sistémico y otras enfermedades auto-inmunes, caracterizado porque --
comprende:

20 a) tamizar timo fetal de ternera, solamente, para
obtener, a partir del mismo, células de timocitos dispersadas;

b) suspender dichas células de timocitos dispersa-
das en una solución isotónica de salmuera tamponada, hasta un recuen-
to celular de aproximadamente $1-1,5 \times 10^6$ células/ml;

25 c) colocar por lo menos una porción de unos 0,05
ml de dichas células de timocitos dispersadas sobre una platina de mi-
croscopio;

d) secar dicha cantidad de suspensión de células -
de timocitos dispersadas sobre la citada platina;

30 e) fijar la suspensión celular seca con solución -

de Carnoy modificada;

f) lavar dicha suspensión fija con agua; y

g) secar dicha suspensión fijada y lavada.

5

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende la etapa adicional de colocar la platina secada, fijada y lavada en un recipiente hermético al aire conteniendo un desecante.

10

3.- Procedimiento para preparar un reactivo de diagnóstico seco, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de veintiseis hojas escritas a máquina por una sola cara.

27 JUL. 1976

Madrid,

AMERICAN CYANAMID COMPANY,

GOMEZ ACEBS Y MODET

Dr. p. Firmador: L. Gaeta Fernández

