



435760

ES

11	NUMERO
21	
22	FECHA DE PRESENTACION

A 1

PATENTE DE INVENCION

40	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	451.875		18 de Marzo de 1974		EE.UU. de A.

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA

64	TITULO DE LA INVENCION	CONCEDIDA			
	PROCEDIMIENTO DE ANALISIS RADIOISOTOPICO COMPETITIVO PARA MEDIR LA CONCENTRACION DE FOLATO EN EL SUERO.	25 NOV. 1976			

71	SOLICITANTE (S)
	CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY.

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	10900 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio 44106, EE.UU. de A.

72	INVENTOR (ES)

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	D. Jaime Gómez-Acebo y Modet

La presente invención comprende un análisis radioisotópico rápido y menos costoso para medir la concentración de folato en el suero sanguíneo. Este procedimiento utiliza ^3H -pterilmonoglutamato, ácido 5-metiltetrahidrofólico sin radioactivar, y un aglutinante del folato parcialmente purificado, como puede ser por ejemplo un aglutinante del folato extraído de riñones de cerdo. El procedimiento comprende relacionar radioisotópicamente las cantidades combinadas de un folato radioactivado y un folato conocido a varias concentraciones del folato conocido en un sistema que contiene una cantidad predeterminada del folato radioactivado, una cantidad predeterminada del factor aglutinante para los folatos, y una cantidad predeterminada de suero experimental desfolatado. Entonces se determina radioisotópicamente la cantidad combinada del folato radioactivado en un sistema que contiene la cantidad predeterminada de folato radioactivado, el suero experimental y la cantidad predeterminada del factor aglutinante. Después la cantidad combinada del folato radioactivado determinada en la segunda etapa se correlaciona mediante la relación determinada en la primera etapa para averiguar la cantidad de folato en el suero.

El factor aglutinante se prepara homogenizando un órgano de animal que contenga factor aglutinante en un sistema líquido apropiado, v.g., agua, y extrayendo con un disolvente apropiado por ejemplo acetona. El extracto de acetona se extrae entonces con ácido cítrico o ácido orgánico polibásico hidrosolubles similar y después con etanol fraccionado para obtener una fracción insoluble en alcohol que se segrega. La fracción segregada se utiliza entonces para preparar una suspensión en una solución tampón apropiada que, a su vez, se separa por centrifugación para obtener un líquido sobrenadante que contiene

el factor aglutinante. El factor aglutinante mas idóneo se deriva del riñón del cerdo.

Principios Fundamentales del Invento y Tecnología Anterior

5 El presente invento se refiere, según se ha indicado, a un análisis enzimático o de cofactor bioquímico radioisotópico competitivo para medir la concentración del folato en el suero. El término "folato" es bien conocido por los expertos en bioquímica. Es genérico y comprende no solamente los derivados de ácido pteroilmonoglutámico, sino también las sales y
10 otros productos de neutralización del mismo. Si un material se encuentra en la forma ácida o en la forma básica dependerá del pH del medio en el que se haya. Así, el término "folato" comprende derivados sustituidos de ácido pteroilmonoglutámico y las formas de poliglutamato así como ésteres, sales y otros derivados que comprenden no solamente el grupo carboxilo sino también otros puntos de sustitución en la molécula. Frecuentemente es útil conocer la concentración de folato en el suero para confirmar la etiología de la anemia de un paciente. Los análisis
15 microbiológicos conocidos actualmente para medir la concentración de folato en el suero exigen tiempo y, como otros análisis microbiológicos, se ven afectados por agentes antimicrobianos y antineoplásticos que pueden encontrarse presentes en la muestra de suero. Se puede tomar como referencia el trabajo de Herbeert titulado "Método de Adición Aséptica para Lactobacillus Casei de la Actividad del Folato en el Suero de seres Humanos", J.
20 Clin Path. 19: páginas 12 - 16, 1966; y Grossowicz et al, "Determinación Microbiológica de Derivados de Acido Fólico en la Sangre", que aparece en Blood 20, páginas 609 - 616, 1962. El procedimiento del invento se distingue de estos análisis microbiológicos porque utiliza un procedimiento de radioanálisis ca-
30

racterizado por un aglutinante competitivo directo entre un folato radioactivado y un segundo folato, conociéndose en un caso el segundo folato y siendo en el segundo caso el segundo folato un folato de suero, por lo que se puede determinar la concentración del folato en el suero. Este análisis se puede completar en un trabajo de una mañana y los resultados se pueden obtener al final del día. Este análisis emplea ^3H -pteroilmonoglutamato (identificado en adelante como ^3H -PGA) como folato radioactivado, ácido d,1,5 metiltetrahidrofólico (denominado en adelante $5\text{CH}_3\text{FH}_4$) como folato conocido, un aglutinante de folato parcialmente purificado extraído del riñón de cerdo u otro órgano de animal apropiado. Este análisis es sensible a 25 picogramos de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$, el folato de suero principal (véase Herbert et al, "Estudios sobre la identificación de un compuesto de folato del suero de seres humanos", J. Clin, Invest. 41; páginas 1134 - 1138, 1962). Al contrario que los análisis microbiológicos, el análisis del invento no se ve afectado por agentes antimicrobianos o antineoplásticos, como puede ser el Metotrexato (ametopterina), ácido 4-(amino- ^{10}N -metilpteroilglutámico). También se puede tomar como referencia a Rothenberg et al, "Radio Análisis del Folato del Suero: Uso de un Sistema Ligante-Aglutinante de Incubación en Secuencia de Dos Fases", New England Journal of Medicine 286: 1335 - 1339, 1972.

Se ha descrito que se encuentran aglutinantes de pteroilmonoglutamato (PGA) y algunos de sus derivados en la leche, suero procedente de algunas mujeres embarazadas, pacientes deficientes en folato, y suero procedente de pacientes con una enfermedad maligna. Se pueden extraer aglutinantes de folato de órganos de diversos animales, particularmente los riñones y el páncreas. El bazo, hígado, corazón y tejido mucular, aunque contie

nen pequeñas cantidades de materia útil como aglutinante, no contienen dicha materia en cantidad económicamente importante. El procedimiento de extracción es en cualquier caso el mismo. Se han obtenido los mejores resultados con factor aglutinante de riñones de cerdo. Por consiguiente, la descripción del procedimiento para extraer el factor aglutinante de órganos de animales se ejemplificará, con relación al procedimiento para extraer factor aglutinante de riñones de cerdo. Se comprenderá que se puede utilizar el mismo procedimiento para la preparación de factores aglutinantes procedentes de otros órganos.

La preparación de aglutinante procedente de riñón de cerdo ha demostrado ser muy útil para establecer un análisis con aglutinante ligador competitivo para medir el folato, especialmente el folato del suero. Además, este aglutinante parece ofrecer un buen sistema de modelo para el estudio y comparación de aglutinante del folato que se encuentra en el suero de pacientes con ciertas enfermedades.

Breve Descripción de los Dibujos

En los dibujos adjuntos, la Fig. 1 es una curva normal típica que demuestra la relación de porcentaje de ^3H -PGA combinado a varias concentraciones de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ en ngs.

La Fig. 2 es un histograma que representa la distribución de la concentración de folato del suero en la población total sometida a análisis.

La Fig. 3 demuestra la relación entre valores obtenidos de sueros analizados por duplicado en dos vías diferentes.

La Fig. 4 representa los valores de folato de suero obtenidos de varios sueros en función al tiempo de equilibración.

La Fig. 5 demuestra la relación entre el procedimiento de análisis del invento y el procedimiento microbiológico de L. casei de la tecnología anterior.

La Fig. 6 representa la especificidad del factor aglutinante de folato de riñones de cerdo para varios derivados de folato.

La Fig. 7 es un gráfico que representa el efecto del pH sobre el aglutinante de ³H-PGA.

Descripción Detallada de la Preparación de Materiales y Métodos

Empleados

Una composición aglutinante de folato de riñón de cerdo se prepara convenientemente empleando riñón de cerdo fresco desengrasado que se ha hecho homogéneo en tres volúmenes (peso/volumen) de ácido cítrico 0,05M o, alternativamente, polvo de riñón de cerdo extractado en acetona (Sigma Chemical) disponible en mercado se prepara en suspensión en diez volúmenes (peso/volumen) de ácido cítrico 0,05M y se agita mediante una hora a la temperatura del ambiente. El volumen de ácido cítrico puede ser del orden de 10 - 15. Si fuera necesario, la solución se ajusta a un pH de 3,5 con ácido clorhídrico 5N. Después de añadir 2-mercaptoetanol a una concentración final de 5mM (milimoles), se agita en la suspensión carbón vegetal agitado finamente dividido (Norit A) a una concentración del orden de aproximadamente 2 % al 5 % (peso/volumen).

La finalidad del carbón vegetal es separar por adsorción el folato que se produce en la fuente de aglutinante del riñón del sistema. Se ha averiguado que las concentraciones, sobre una base de peso/volumen de tan sólo un 2 % aproximadamente, dan excelente rendimiento de aglutinante y separan el folato con eficacia. Las concentraciones de carbón vegetal mas ele-

vadas tienden a eliminar aglutinante al mismo tiempo que folato. Por lo tanto, las concentraciones inferiores de carbón vegetal son preferibles en lo que se refiere a rendimiento de aglutinante. Se puede emplear cualquier otro método de separar entidades moleculares sin destruir el factor aglutinante que tengan pesos moleculares, por un lado, de 400 a 1000 aproximadamente (v. g., folatos) de entidades moleculares que tengan pesos moleculares del orden de 40000 (v. g., aglutinante), tales como cromatografía, tamices moleculares, etc.

El mercaptoetanol ha demostrado mejorar la solubilización del factor aglutinante y el rendimiento, sin afectar al análisis. Su presencia es discrecional. Después de dejar reposar durante un período de 5 a 20 horas a 42 C., la mezcla se centrifuga por espacio de aproximadamente 30 minutos a 13.000 por G a 42 C. para separar el carbón vegetal y cualquier material precipitado. El líquido sobrenadante se ajusta lentamente a un pH de 7,4 con NaOH N y después se mezcla con un volumen igual de etanol absoluto a -202 C. Después de dejar reposar por un período de 4 horas a -202 C., se recoge el precipitado por centrifugación a 13.000xG y se tira. El líquido sobrenadante resultante se pone a una concentración de etanol final del 75 % con alcohol absoluto y se deja reposar hasta el día siguiente a -202 C. El precipitado se recoge por centrifugación a 13.000 x G se seca a la temperatura ambiente y se prepara con el mismo una suspensión en un volumen de tampón de fosfato potásico 0,05 M a un pH de 7,6, siendo la cantidad de tampón de fosfato aproximadamente el 5 % del volumen inicial. La suspensión se agita lentamente por espacio de 20 minutos a 42 C. y después se centrifuga por espacio de 10 minutos a 10.000 x G a 42 C. y se guarda el fluido sobrenadante. Si todavía hay presente algún color

rojo en el precipitado, se añade un pequeño volumen de tampón de fosfato y se repite el procedimiento de extracción. La solución resultante de color paja a rojo representa aproximadamente un rendimiento del 50. % de la capacidad total de aglutinante del extracto inicial en ácido cítrico y muestra un aumento de 20 a 30 veces en actividades específica sobre el extracto de ácido cítrico.

	Concentra ción de Proteína mg/ml.	Ext.Vol. Total cc	Total de Proteína mgs.	Capacidad de Agluti nante pa- ra PGA (n moles)	Actividad Específica n moles PGA/mg. Proteína
Extracto en ácido cítrico crudo	7,6	3500	26.600	29,7	0,0011
10 ppt.Etanol (50-75 %)	6,17	75	462,7	13,6	0,029

Se ha averiguado que el riñón fresco de cerdo tra-
tado según el método de Iwai et al, "Estudios del Acido Fólico
en la Sangre VII Purificación y Propiedades de los Precursores
de Acido Fólico de Eritrocitos Humanos" J. Biol. Chem. 239; pá-
15 ginas 2365 - 2369, 1964 para la preparación de conjugasa, con-
tiene también un aglutinante de folato. No obstante, dichas pre-
paraciones no son tan estables como las elaboradas a partir del
polvo de acetona de preferencia. Las propiedades del aglutinan-
te de folato según se presentan en la presente memoria se deter-
20 minan sobre preparaciones hechas a partir de polvo en acetona.

Los análisis según el presente invento se llevan a
cabo preferiblemente en un tampón de fosfato potásico - ascorba-
to - suero (identificado en adelante como KPAS). Esta solución
tampón se prepara diluyendo suero humano normal de donantes 1:10

en tampón de fosfato potásico 0,05M (pH 7,6) y añadiendo 2,0 miligramos de ácido ascórbico por cm^3 a la solución final. El suero humano normal de donantes se forma mezclando entre sí una pluralidad de muestras de suero procedentes de muestras de sangre humana normal. Antes de emplear el suero mancomunado, se trata con carbón vegetal activado en polvo (Norit A) para separar el folato endógeno. Esta operación se realiza añadiendo 15,0 miligramos de carbón vegetal activado por cm^3 de suero, agitando lentamente la suspensión por espacio de 10 minutos a 42 C. y centrifugando después para separar el carbón vegetal. De este modo se obtiene un suero que se denomina "exento de folato" y que se congela en pequeñas cantidades alícuotas a -80 C. hasta que se utiliza en la solución tampón de análisis. Según aparecerá más adelante puede ocurrir folato ligado en suero humano que no se puede separar empleando técnicas simples de absorción con carbón vegetal.

El folato normal o conocido (ácido d,l,l-5-metil tetrahidrofólico) (Sigma Chemical) se disuelve en solución tampón de fosfato potásico 0,05M pH 7,6 y después se pone a 0,1M con 2-mercaptoetanol. En este caso el mercapto-alcohol actúa como estabilizador para el folato o ácido fólico. La pureza del $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ se determina espectrofotométricamente y la concentración se determina empleando un ϵ 1 % cm^{-1} a 290 nm de 665 (Gupta et al, "Preparación y Propiedades de 5-Metiltetrahidrofolato cristalino y compuestos relacionados con el mismo", Arch. Biochem. Biophys., 120, páginas 712 - 718, 1967). La solución en existencia (aproximadamente 5 microgramos por cm^3) se congela en pequeñas cantidades alícuotas a -80 C. hasta el momento de su uso. Esta solución ha demostrado ser estable durante un período de por lo menos 6 meses.

Como compuesto trazador o radioactivado se utiliza convenientemente ^3H -PGA de actividad específica elevada (15 - 50 Ci/mmoles; Amersham Searle). Se disuelve en etanol al 20 % y se almacena a -80°C . Para utilizarse en el análisis, la solución original se diluye 1 : 100 en tampón de fosfato potásico (0,05M. pH 7,6).

Se prepara carbón vegetal activado finamente dividido recubierto con albúmina mezclando volúmenes iguales de carbón vegetal activado en polvo al 5 % en suspensión (Norit A) (peso/volumen, en agua destilada) y una solución acuosa al 1 % de albúmina de ganado bovino (fracción V de Cohn). Esta suspensión es estable al menos durante un mes cuando se almacena a 4°C . A este respecto se observará que cualquier material de peso molecular relativamente elevado puede utilizarse para recubrir el carbón en lugar de la albúmina de ganado bovino como, por ejemplo, hemoglobina o dextrán (que es un polisacárido) de una gama de peso molecular apropiada, v.g., 10.000 a 50.000.

Las muestras se cuentan empleando técnicas de escintilación normal en líquido, bien conocidas en la profesión, en un fluido de escintilación que, por ejemplo, se puede preparar mezclando volúmenes iguales de tolueno que contiene 13,7 μ g de 2,5-difeniloxazol (PPO/1, grado de escintilación) y 0,28 gramos de 1,4-di-2-(4-metil-5-feniloxazolil)benzina (POPOP/1, grado de escintilación), y un agente humectante iniónico, como puede ser un producto de condensación de óxido de alquileo con un alquilfenol, v.g., nonifenol + 9 moles de óxido de etileno (Triton X-10). Se recogen contajes suficientes para obtener un error de contaje del 4 % o menos.

La sangre que se ha de analizar para hallar la cantidad de folato se obtiene por fextracción de vena y se deja

coagular a la temperatura ambiente. El suero se recoge por centrifugación y se añaden 5 miligramos de ácido ascórbico por cm^3 de suero. Cuando se recoge el suero de esta manera y se almacena a -20°C ., el nivel de folato permanece estable por lo menos durante 3 meses.

Según se ha indicado anteriormente, una fase característica del presente invento es la de la terminación de la curva normal. La tecnología anterior ha demostrado que el folato de suero humano principal es $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ (Herbert et al, "Estudios sobre la Identificación de un Compuesto de Folato del Suero Humano" supra) y, por lo tanto, se utiliza para competir en lugares de ligazón de PGA en la preparación de aglutinante de riñón de cerdo. Empleando cantidades en aumento de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ y una cantidad constante conocida de ^3H -PGA y una cantidad constante conocida del factor aglutinante, preferiblemente con una parte alícuota de suero de donantes desfolatado como modelo, se puede relacionar el porcentaje de reducción del complejo de folato/aglutinante radioactivado formado ($\% ^3\text{H}$ -PGA combinado) a las diferentes concentraciones conocidas de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$. Para determinar la concentración de folato en una muestra de suero dado, solamente es necesario, por lo tanto, comparar el porcentaje de ^3H -PGA que se halla cuando se añade una parte alícuota de suero a la mezcla de incubación como reposición de la parte alícuota de suero de donantes desfolatado, si se utiliza, a una serie de concentraciones conocidas de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ representadas en una curva normal. Se puede tomar como referencia la Fig. 1 que es un ejemplo típico de una curva normal determinada según este procedimiento.

En esta prueba, la mezcla de incubación contenía 200 picogramos de ^3H -PGA en 20 - 40 microlitros, $0,1 \text{ cm}^3$ de so-

lución de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ (diluyéndose la solución original en serie en solución tampón de fosfato potásico - ascorbato a la concentración apropiada) y $0,1\text{ cm}^3$ de solución aglutinante en KPAS suficiente, de forma que el volumen final de la mezcla de incubación fuera $1,0\text{ cm}^3$. Para obtener un grado elevado de sensibilidad, el aglutinante se diluye de forma que $0,1\text{ cm}^3$ sean suficiente para aglutinar el 70 al 80 % del ^3H -PGA cuando no hay presente $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ competitivo. Como el análisis según el presente invento es de tipo aglutinante competitivo, el aglutinante se añade al final a la solución de ^3H -PGA y $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ en el KPAS. Antes de añadir el aglutinante, se deja incubar la mezcla de reacción por espacio de 30 minutos a 42 C. en la oscuridad para permitir el equilibrio del ^3H -PGA y el $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ en el KPS. Después de añadir el aglutinante, se incuba la reacción por espacio de 45 minutos adicionales a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Se separan ^3H -PGA libre y combinado al final de la incubación colocando el tubo en hielo y añadiendo $1,0\text{ cm}^3$ de la suspensión de carbón vegetal activado en polvo recubierto con albúmina que absorbe el ^3H -PGA libre. Después de añadir la suspensión de carbón vegetal, se dejan reposar los tubos por espacio de 2 a 3 minutos y después se centrifuga durante 10 minutos a $6.000 \times G$ a 42 C. para nodulizar el carbón vegetal. Se prepara una dispersión con una parte alícuota del fluido sobrenadante transparente procedente de la etapa de centrifugación y se cuenta en $15,0\text{ cm}^3$ del fluido de escintilación descrito anteriormente.

Se prepara un control de carbón vegetal (llamado en adelante cc) sustituyendo aglutinante por $0,1\text{ cm}^3$ de KPAS en un tubo. Los contajes se quedan en el líquido sobrenadante des-

pués del tratamiento con suspensión de carbón vegetal representa los contajes de tritio no absorbible. Normalmente suele ser del orden del 5 % al 7 % el total de contajes incubados. Si el PGA no era por lo menos 85 % puro según verificación por la

5 prueba de precipitación de sulfato de zinc descrita en Rothenberg et al, New England Journal of Medicine 286; 1335 - 1339, 1972, se prepara un segundo control. Este control, llamado en adelante control aglutinante máximo o (mbc), se prepara incubando el ^3H -PGA con una parte alícuota de aglutinante sin diluir

10 preparado según se ha descrito anteriormente. Los contajes por minuto (cpm) en el fluido sobrenadante después de tratamiento con carbón vegetal representan el número máximo de contajes que se pueden ligar. La combinación neta de cpm en cualquier muestra se calcula restando el valor cc del número total de cpm en

15 la muestra. El porcentaje de ^3H -PGA combinado en una muestra dada se calcula de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ } ^3\text{H-PGA combinado} = \frac{\text{muestra de cpm} - \text{cc}}{\text{cpm mbc} - \text{cc}} \times 100$$

La curva normal se construye calculando el porcentaje de ^3H -PGA combinado y trazándolo en gráfico en función a

20 la concentración de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ para obtener una curva como la indicada en la Fig. 1. Como el folato tritiado es inestable, es preferible en todos los casos determinar un "mbc".

En el análisis de suero humano se analizaron por rutina 0,1 cm³ alícuotas de suero. Las muestras se añadieron a

25 0,8 cm³ de una suspensión tampón de fosfato potásico - ascorbato (KPA) que es igual que el KPAS pero sin el suero desfolatado y que contiene 200 picogramos de ^3H -PGA. Según se ha descrito

anteriormente, las muestras se incuban por espacio de 30 minutos, después de cuyo período se añade el aglutinante. El resto del procedimiento es igual que el seguido para determinar la curva normal ilustrada en la Fig. 1. La validez del análisis se determinó: (1) analizando sueros con el análisis de aglutinante ligante en secuencia descrito por Rothenberg supra, (2) analizando sueros con el método de L. casei descrito por Herbert en J. Clin. Path. 1912 - 16, 1966, (3) añadiendo cantidades conocidas de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ y calculando el porcentaje de recuperación, y (4) analizando sueros que se habían desproteínizado calentando en un tubo de ensayo sumergido en un tampón de ascorbato - fosfato hirviente.

Los resultados de las pruebas obtenidas son como sigue:

La Fig. 1, según se ha indicado anteriormente, ilustra una curva normal típica obtenida cuando se traza el porcentaje de ^3H -PGA en función a la concentración de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$.

En una valoración, se analizó un total de 165 muestras de suero diferentes empleando el método del presente invento. 30 muestras de suero procedían de pacientes con anemia negaloblástica o macrocítica. Las muestras restantes eran de sujetos "normales". La Fig. 2 en los dibujos adjuntos es un histograma que ilustra la distribución de la concentración de folato de suero en la población total en experimentación. La concentración de folato de suero por término medio en pacientes con anemia negaloblástica (determinada por morfología de médula ósea) o anemia macrocítica (un volumen corpuscular por término medio superior a 120 micras cúbicas, siendo normales 86 - 93) pero con niveles normales de vitamina B12 en el suero, es de 0,74 ng/cm^3 mas o menos 0,17 ng/cm^3 (error normal del promedio, S.E.

M.). La gama era de 0,0 a 1,5 ng/cm³. La concentración por término medio de folato del suero en la población normal consistente en público en general, estudiantes de medicina, subgraduados y personal de investigación) fue de 6,1 ng/cm³ mas o menos 0,3 ng/cm³ (S.E.M.). La gama de 1,5 a 16,0 ng/cm³. En la población que se suponía normal el 14,2 % mostró niveles de folato entre 1,5 y 3,0 ng/cm³. Esta población tenía un volumen corpuscular por término medio de 97 micras cúbicas ensayadas con 20 muestras con una gama de 95 micras cúbicas a 103 micras cúbicas, mientras que el volumen corpuscular por término medio en la población normal (v. g., folato 3,0 ng/cm³) era de 91 micras cúbicas con una gama de 86 micras cúbicas a 93 micras cúbicas en 25 muestras.

El promedio de porcentaje de variación en las muestras analizadas por triplicado en el mismo día fue de 3,1 %.

La Fig. 3 ilustra la relación entre los valores obtenidos de sueros analizados según el invento por duplicado en dos días diferentes. El promedio de variación fue de 4,6 %.

La recuperación de 5CH₃FH₄ añadido de una forma exógena se indica en la Tabla II. La baja recuperación obtenida en el suero con un bajo nivel endógeno de folato sugiere la presencia de aglutinante sin saturar en el suero de los pacientes.

TABLA II

Recuperación de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ Añadido a Muestra de Suero

Muestra	Folato Endógeno (ng/cc)	$5\text{CH}_3\text{FH}_4$ Exógeno (ng/cc)	Valor esperado (ng/cc)	Valor real (ng/cc)	Porcentaje de recuperación
1	2,7	4,3	7,0	6,2	88,5
2	8,4	4,3	12,7	13,6	100,6
3	4,2	4,3	8,5	12,0	141,1
4	4,6	4,3	8,9	8,5	97,7
5	9,0	4,3	13,3	12,0	90,5
6	6,2	4,3	10,5	12,0	114,0
7	6,2	8,6	14,8	16,0	108,1
8	5,4	8,6	14,0	15,2	108,5
9	5,4	8,6	14,0	12,4	88,6
10	4,6	8,6	13,2	12,6	95,5
11	1,3	8,6	9,9	3,6	36,4
12	0,7	8,6	9,3	4,2	45,2

El $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ se diluyó en tampón de fosfato - ascojato y se añadió en 0,01cc a 1,0 cc alícuotos de suero. Algunas de las muestras se volvieron a congelar entonces antes de análisis.

$$5 \quad \% \text{ de recuperación} = \frac{\text{valor analizado}}{\text{valor esperado}} \times 100$$

Según se ha indicado anteriormente, se dejó que se equilibrara el ^3H -PGA con el suero antes de añadir el aglutinante. Los valores de folato de suero obtenidos para varios sueros en función al tiempo de equilibración se indican en la Fig. 4. Se pudo averiguar que el período de 30 minutos daba una respuesta máxima y, por consiguiente, este es el período empleado en los análisis. Tomando como referencia la Fig. 4, las leyendas A, B, C y D indican sueros procedentes de pacientes diferentes. Aunque no se conoce con precisión el por qué algunas muestras muestran un aumento en concentración de folato según indican los ejemplos A y B en particular, a pesar de todo, para asegurar una determinación precisa sobre el espectro mas amplio de concentraciones, se ha determinado, que es preferible una incubación durante un período de por lo menos 30 minutos, por otro lado, si la incubación se prolonga en exceso a unos 90 minutos, por ejemplo, se establece una acción destructiva y las lecturas obtenidas de concentración de folato comienzan a reducirse. Es preferible una incubación de 30 a 60 minutos.

25 En la Tabla III se expone una comparación de sueros enteros y extractados.

TABLA III

Comparación de Niveles de Folato de Suero determinados Analizando Suero Entero y Extracto de Suero.

Muestra	<u>Concentración de Folato (ng/cc de suero)</u>	
	<u>Suero entero</u>	<u>Extracto de suero o suero desnaturalizado</u>
13	0,0	1,0
14	3,5	5,0
15	14,6	15,5
16	5,2	6,0
17	4,1	6,0
18	3,8	5,0
19	3,1	4,0
20	10,0	13,0
21	0,8	2,2

Se prepararon extractos de suero diluyendo suero 1 : 5 en KPA al que se habían añadido 5,0 ng/cc de ácido ascórbico adicionales. Los sueros se colocaron entonces en un baño de agua hirviendo por espacio de 5 minutos para desnaturalizar el suero. La proteína cuagulada se eliminó por centrifugación. Una parte alícuota de sobrenadante transparente se analizó para hallar su contenido de folato. Como la proteína se había extraído de la muestra, se prepararon las muestras normativas en KPA en lugar de KPAS para que las condiciones de análisis fueran idénticas. La muestra 13 representa los resultados obtenidos analizando suero tratado con carbón vegetal.

Aunque el suero humano normal de donantes, tratado con carbón vegetal, no mostraba actividad de folato cuando se medía como suero entero, se desprendía una cierta actividad de folato cuando el suero era suero extractado o desnaturalizado. Este descubrimiento tiene una gran importancia según se evidenciará mas adelante.

La Tabla IV indica la comparación de los análisis radioisotópicos de aglutinante competitivo y de aglutinante ligante en secuencia en un cierto número de sueros sobre una amplia gama de valores.

TABLA IV

Comparación de los Análisis Competitivo Directo y
en Secuencia.

<u>Muestra</u>	<u>ng Folato/cc suero</u>	
	<u>Análisis Competitivo Directo</u>	<u>En secuencia</u>
22	4,0	3,8
23	6,5	6,3
24	15,0	17,0
25	9,7	11,0
26	2,5	2,3
27	2,2	1,7
28	5,4	5,2

El análisis en secuencia se realizó según el método de Rothenberg et al supra; la única diferencia fue la sustitución del extracto aglutinante de cerdo por aglutinante de leche. En esta serie particular de análisis se analizaron muestras de suero de 20 microlitros. Los resultados presentados representan el promedio de determinaciones por triplicado.

La Fig. 5 demuestra la relación entre el procedimiento de análisis presente y el análisis microbiológico de L. casei descrito por Herbert, supra, para la determinación de folatos del suero. El análisis microbiológico era consistentemente superior en una constante aritmética en lugar de una constante geométrica. Esta diferencia en los dos análisis se refleja en las gamas normales establecidas para cada análisis. El análisis de L. casei tiene una gama normal de 4 a 20 ng/cc, mientras que la "gama normal" en el análisis radioisotópico es de 3 a 16 ng/cc. Un procedimiento idóneo para la preparación del factor aglutinante de folato de riñón de cerdo se expone a continuación.

Exposición de Resultados

El procedimiento de análisis del presente invento utiliza ^3H -PGA de alta actividad específica, disponible en mercado, según se ha indicado anteriormente, sensible a 25 picogramos de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$. Sin radioactivar. Los folatos del suero se determinan comparando el grado de inhibición competitiva de radioactividad observada cuando una parte alícuota de suero se añade a la mezcla de ^3H -PGA y aglutinante de folato, a la inhibición observada cuando se añaden cantidades conocidas de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ a la reacción de incubación. Se utiliza ácido 5-metiltetrahidrofólico ($5\text{CH}_3\text{FH}_4$) como folato de referencia puesto que ha demostrado ser el principal folato de suero (Herbert et al, J. Clin. In-

vest. 41: 1134 - 1138, 1962, supra). Además, cuando se ha utilizado PGA en lugar de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ para calcular la curva normal de la Fig. 1, el resultado han sido niveles falsamente inferiores de folatos de suero debido a la mayor competición por parte del PGA sin radioactivar con respecto al $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ respecto a lugares de aglutinamiento en el factor aglutinante. Este aglutinamiento preferencial del PGA respecto al aglutinante de riñón de cerdo se ha observado también las preparaciones de aglutinante de folato extraída de la leche, (véase Ford et al, "Proteína aglutinante del Folato en la leche", J. Dairy Research 36: 435, 1969).

No obstante, al contrario que el aglutinante de leche cuando se emplea aglutinante de folato de riñón de cerdo en este análisis con aglutinante en secuencia según ha descrito Rothenberg, supra, v.g., cuando se incubaba derivado de folatos sin radioactivar con el aglutinante antes de añadir ^3H -PGA, ha habido solamente un desplazamiento del 5 % al 10 % de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ combinado por el PGA aún cuando se incubara a temperatura ambiente. Así, aunque hay un aglutinamiento preferencial evidente de PGA basado en estudios de competición directa, la falta de desplazamiento de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ combinado ha hecho posible emplear un análisis competitivo de una etapa en lugar del análisis de aglutinante ligante en secuencia de la tecnología anterior y aún así obtener una sensibilidad a 25 picogramos de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$. Las observaciones: (1) que el suero tratado con carbón vegetal tiene actividad de folato después de haberse extractado y (2) que cuando los experimentos de recuperación de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ se realizan empleando suero con niveles de folato endógeno inicialmente bajos, dando lugar a una deficiente recuperación del folato añadido, sugieren que hay un depósito de folato combinado en el suero humano que no se detecta con un análisis radioisotópico a me

nos que se extracte el suero antes del análisis.

A este respecto, Markkenen y Peltola, "Proteínas portadoras de activada de ácido fólico en el suero humano", Acta Haemat 45: 106 - 111, 1971, han fraccionado suero humano y hallado 3 áreas de actividad de ácido fólico. Dos de estas tres áreas se encuentran en regiones de proteínas de elevado peso molecular. Ahora se ha descubierto que parte de la actividad del ácido fólico se combina firmemente en una de estas dos fracciones. Se tiene evidencia que apoya la existencia de un "depósito de folato combinado" en el suero sanguíneo humano comparando los resultados obtenidos del análisis del suero entero y extraído o desnaturalizado en la Tabla III anterior. Como el aumento en la concentración final de suero es una constante aritmética (0,0 a 3,0 nge) no directamente proporcional al valor del folato del suero entero, este resultado conduce al descubrimiento de la existencia de un pequeño depósito combinado de folato. El grado del depósito, combinado, o su variación de una norma determinada para un individuo, parece que puede ser de importancia principal diagnóstica. La cantidad de depósito combinado de folato en el suero se determina restando del folato total determinado utilizando suero desnaturalizado la cantidad de folato determinado empleando suero sin desnaturalizar.

En este punto debemos poner de relieve que el PGA y cualquiera de sus derivados (que puedan competir para el aglutinamiento de PGA en el factor aglutinante de folato de riñón de cerdo) asociado de una forma suelta con proteína del suero, principalmente albúmina, se detectan por el análisis radioisotópico según se pone de evidencia por los experimentos de recuperación. A este respecto, tómese como referencia Elsborg "Aglutinamiento de ácido fólico a proteínas de plasma de seres humanos";

Acta Haemat 48; 207 - 212, 1972 y Johns et al, "Metabolismo de ácido fólico tritiado en el hombre", J. Clin. Invest. 40; 1684, 1961. La actividad del folato combinado no extractable en carbón vegetal explicada anteriormente puede representar el folato combinado en aglutinante o aglutinante del folato del suero ané-
5 logo a los que ya se han descrito con relación a la leche, en el suero, y en leucocitos procedentes de pacientes embarazadas o que tienen leucemia granulócica crónica, y en el riñón del cerdo. A estos respectos, tórnense como referencia Ghitis, "Aglu-
10 tinante de Folato en la Leche", Am. J. Clin. Nutr. 20; 1015 - 1024, 1967; Ghitis et al "Aglutinamiento de Acido Fólico y deri-
vados por medio de Leche", Am. J. Clin. Nutr. 22; 156 - 162, 1969; y Rothenberg et al "observaciones adicionales sobre el factor aglutinante de folato en algunas células leucémicas", J.
15 of Clin. Invest. 50; 719 - 726, 1971.

El valor de examen diagnóstico de analizar suero entero no se ve afectado perjudicialmente por este folato combi-
nado según pone de evidencia la correlación entre los hallazgos hematológicos y el folato de suero medido. No obstante, se debe
20 reconocer que el valor del suero entero obtenido según el presente invento es una indicación de la concentración de folato de suero con relación a una normativa de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$, pero no necesariamente igual al folato de suero total. Se puede obtener un
total del folato del suero extractando primero las muestras de
25 suero. Como se desconoce la naturaleza del folato combinado, el valor obtenido sería solamente una concentración de folato rela-
tiva al $5\text{CH}_3\text{FH}_4$. Si el folato combinado es un derivado oxidado de PGA, exhibiría una mayor competición que el $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ sobre una base molar, y por lo tanto, daría por resultado valores fal-
30 samente elevados. Como existe una buena correlación clínica en-

tre los hallazgos hematológicos y el nivel de folato del suero entero analizado por el método descrito en la presente memoria, este procedimiento sirve como prueba rápida y barata que ayuda a la diagnosis de deficiencia de folato.

5 Entre los diversos factores investigados del aglutinante del folato, el derivado del riñón de cerdo parece ser notablemente superior. A este respecto, la especificidad del factor aglutinante del folato se examinó empleando derivados de folato sin radioactivar para competir con ^3H -PGA, ^3H -metotrexano (MTX) o ácido 14C-5-metiltetrahydrofólico ($5\text{CH}_3\text{FH}_4$) respecto a sitios de enlace o aglutinamiento. Los estudios de aglutinamiento directo con ^3H -MTX (13Ci/mmol) han demostrado que su afinidad aglutinante era por lo menos 500 veces menor que la del ^3H -PGA. Los resultados obtenidos con $14\text{C}-5\text{CH}_3\text{FH}_4$ eran esencialmente los mismos que los obtenidos con ^3H -PGA. No obstante, como el $14\text{C}-5\text{CH}_3\text{FH}_4$ tiene una actividad específica menor, se llevaron a cabo pocos experimentos competitivos. Aún así, se puede declarar que el extracto aglutinaba mas del 90 % del $14\text{C}-5\text{CH}_3\text{FH}_4$ disponible, indicando que ambas formas dextra y levo del folato reducido se aglutinaban. Se han indicado resultados similares respecto al aglutinante de leche. Con el aglutinante de riñón de cerdo, se ha observado también un alto grado de competición por parte del ácido d,l-tetrahydrofólico (Fig. 6A) y por parte de ácido N-10-formiltetrahydrofólico, (no ilustrado) respecto a lugares de aglutinamiento de PGA. No obstante, estos resultados no revelan si existe alguna diferencia en el aglutinamiento de las formas dextro y levo. La falta de competición equimolar del ácido del tetrahydrofólico y sus derivados respecto a lugares de aglutinamiento de ^3H -PGA puede que se deba a la presencia del isómero dextro.

10

15

20

25

30

Para determinar los datos para la Fig. 6, la primera parte de la Fig. 6 (Fig. 6A) muestra la competición directa respecto a lugares de aglutinamiento de PGA en el aglutinante de folato de riñón de cerdo. La mezcla de reacción contenía 0,225 moles de ^3H -PGA (54Ci/milimol), derivados de folatos sin radioactivar según se ha indicado, suficiente factor aglutinante de riñón de cerdo para aglutinar aproximadamente 0,18 pmoles de PGA, un micromol de 2-mercaetanol, 50 micromoles de fosfato potásico, un pH final de 7,6, en un volumen total de 1,0 cm^3 . La reacción se inició añadiendo aglutinante de folato y se dejó que prosiguiera por espacio de 30 minutos a la temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se detuvo colocando los tubos en hielo y añadiendo 1,0 cm^3 de una suspensión de carbón vegetal activado en polvo recubierto de albúmina. Al cabo de 2 a 3 minutos en hielo, los tubos se centrifugaron a 6.000 x G por espacio de 10 minutos a 4°C. para eliminar el folato "libre" absorbido por el carbón vegetal. Se contó 1,0 cm^3 de fluido sobrenadante transparente, que contenía el complejo folato/aglutinante, mediante espectroscopía de escintilación en líquido según procedimiento conocidos. Se prepararon controles de carbón vegetal sustituyendo solución tampón por aglutinante en una serie de tubos, para determinar el número de contajes no eliminados por el carbón vegetal. Se calculó el aglutinante máximo en porcentaje por la fórmula:

$$\frac{\text{cpm en el tubo de muestra} - \text{cc} \times 100}{\text{cpm en tubo cero} - \text{cc}}$$

La segunda parte de la Fig. 6 (Fig. 6B) muestra el efecto de la adición en secuencia de derivados de folato

sin radioactivar y ^3H -PGA. Las condiciones de aglutinamiento fueron similares a las empleadas para obtener los datos que aparecen en la Fig. 6A, excepto que se añadieron 3 pmoles de ^3H -PGA a la reacción que contenía factor aglutinante suficiente para aglutinar aproximadamente 2,5 pmoles de PGA. El aglutinante se incubó previamente por espacio de 30 minutos en la oscuridad a la temperatura ambiente con derivados de folatos sin radioactivar según se ha indicado. Entonces se añadió el ^3H -PGA a la reacción dejando que continuara por espacio de 30 minutos adicionales y deteniéndose y contándose por el mismo método seguido para obtener los datos de la Fig. 6A. Se obtuvieron resultados similares cuando se empleó ácido 14C-5-metiltetrahidrofólico en lugar de ^3H -PGA.

Contrastando con los factores aglutinantes de leche conocidos donde el PGA puede desplazar $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ combinado, la Fig. 6B ilustra la ausencia sustancial de dicho desplazamiento cuando se emplea el factor aglutinante de riñón de cerdo del presente invento. La curva calculada de la Fig. 6B representa la relación que cabe esperar equilibrando sobre una base molar la capacidad aglutinante del factor aglutinante del riñón de cerdo con los pmoles conocidos de folato análogo añadido en ausencia de cualquier desplazamiento. Es evidente que el factor aglutinante de riñón de cerdo aglutina el $5\text{CH}_3\text{FH}_4$, que es el folato de suero principal, con un grado de seguridad que excluye el desplazamiento sensible por el ^3H -PGA. Aún cuando se incuba a 21°C., una temperatura que es favorable a la reacción de desplazamiento con factor aglutinante de leche, menos del 10 % del $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ combinado se desplaza con PGA. El factor aglutinante de riñón de cerdo difiere por lo tanto de otros factores aglutinantes de folato de elevada afinidad, como los que se encuentran

en la leche y en el suero y en leucocitos de algunos pacientes con leucemia granulocítica crónica.

La curva de PGA de la Fig. 6B ilustra además que la seguridad de aglutinamiento del factor aglutinante de riñón de cerdo con PGA y $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ son aproximadamente iguales. Por consiguiente, el factor aglutinante de riñón de cerdo del presente invento permite el uso de un análisis competitivo (de una fase) para medir la concentración de folato en el suero.

Refiriéndonos a ambas Figs. 6A y 6B, se ilustra la sensibilidad del factor aglutinante del riñón de cerdo a los derivados de folato. De un modo mas particular, se ilustra la sensibilidad o afinidad del factor aglutinante hacia los derivados de folato con relación al material trazador tritiado PGA se ilustra por la pendiente relativamente pronunciada de las curvas. Por consiguiente, se mejora la precisión de la correlación entre el contaje de suero experimental y la curva normal.

El factor aglutinante de riñón de cerdo ha demostrado una preferencia entre PGA y $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ del orden de 1 : 2. Esto se ilustra tomando como referencia la Fig. 6A considerando el 50 % de valores aglutinantes máximos. Específicamente, para conseguir un 50 % de inhibición, se necesita aproximadamente 0,16 pmoles de PGA, mientras que se necesita aproximadamente 0,32 pmoles de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ para conseguir la misma inhibición. Contrastando con la característica de sensibilidad de 1 : 2 del factor de aglutinante de riñón de cerdo, un factor aglutinante de leche es de 7 a 10 veces menos sensible al $5\text{CH}_3\text{FH}_4$. En el contexto de la Fig. 6A, un factor aglutinante de leche mostraría una inhibición del 50 % al añadirse aproximadamente de 1,1 a 1,6 pmoles de $5\text{CH}_3\text{FH}_4$. Por lo tanto, es evidente que el factor aglutinante de leche da por resultado una curva menos deseable

(v. g., menos pronunciada) para fines de correlación. Las imprecisiones introducidas por la variación en sensibilidad bastante notable del factor aglutinante de leche en combinación con las características de seguridad de aglutinamiento inadecuadas hacen que el factor aglutinante de leche sea inaceptable en un análisis competitivo (una fase).

La sensibilidad del factor de riñón de cerdo permite también llevar a cabo el análisis con una muestra de suero relativamente pequeña. En muchos casos, el tamaño de la muestra está limitado por consideraciones prácticas como cuando se trata de un paciente de muy corta edad. Además, es conveniente emplear una muestra relativamente pequeña puesto que de este modo se reduce al mínimo los efectos secundarios o no específicos que pudieran surgir.

Incubando préciamente una parte alícuota de 1,0 cc de extracto aglutinante de riñón de cerdo con una capacidad de aglutinamiento de 25 ng PGA/cc, con 1,0 cc de RNase (Worthington, 2 microgramos por cc) o con DNase 1 (Worthington, 2 microgramos por cc) por espacio de 30 minutos a 37 cc no se produce efecto en el aglutinamiento de ^3H -PGA. La incubación prévia con 1,0 cc de una solución de tripsina por espacio de 30 minutos inactiva completamente el factor aglutinante de riñón de cerdo. Todos los demás factores aglutinantes se inactivan con una solución de tripsina 1 : 250, 1 mg/cc.

El efecto del pH sobre el aglutinamiento se representa en la Fig. 7 utilizando polvo de carbón vegetal activado recubierto con albúmina para separar PGA "combinado" y "libre"; el punto de 1/2 de aglutinamiento máximo era aproximadamente de un pH 4,5. No se producían diferencias notables en el caso de que el aglutinante o el folato estuviera en exceso. No se ha ob

servado efecto alguno sobre el aglutinamiento a cualquier pH cuando varios de los cationes devilantes inorgánicos comunes por ejemplo calcio, zinc y magnesio se encontraban presentes a una concentración de 5 mM o cuando se añadían a la mezcla de in-
5 cubación agentes de quelación tales como EDTA (ácido etildiami-
na tetracético) 20 mM y citrato (10 mM). Cuando la composición
aglutinante se exponía a úrea 8M o a una solución de hidroclor
ro de guanidina 6M, se perdía la actividad aglutinante. No obs-
tante, la úrea 8M no produce efectos sobre el complejo agluti-
10 nante de folato después de haberse formado, mientras que el
hidrocloruro de guanidina 6M podría perturbar al complejo. Este
efecto del hidrocloruro de guanidina ha demostrado ser casi com-
pletamente reversible.

El régimen de formación de complejo aglutinante
15 de PGA con el factor aglutinante de riñón de cerdo se determinó
a varias temperaturas equilibrando soluciones del aglutinante y
de ^3H -PGA a temperatura apropiada y combinando entonces partes
alícuotas de cada uno, de forma que el ^3H -PGA excediera aproxi-
madamente en un 20 % de la capacidad aglutinante de la composi-
20 ción de factor aglutinante de riñón de cerdo. La reacción se
dió por terminada añadiendo 1,0 cc de suspensión pelada de car-
bón vegetal activado en polvo recubierto con albúmina. Esta úl-
tima fase demostró ser un medio muy rápido y eficaz para dete-
ner la reacción de aglutinamiento. El régimen inicial de agluti-
25 namiento a 37° C. demostró ser del 2,5 % por segundo; a 21° C.,
1,3 % por segundo; y a 4° C., aproximadamente 0,65 % por segun-
do. No hubo disociación notable del complejo aglutinante de ^3H -
PGA al cabo de una hora a 37° C. aún cuando se añadió un exce-
so de 50 veces el PGA sin radioactivar después de haberse forma-
30 do el complejo.

Aunque se obtuvo una actividad específica mayor del aglutinante cuando la extracción inicial contenía 2-mercaptoetanol la presencia de este agente a concentraciones de 10^{-7} a 10^{-1} M no producía efecto sobre la reacción de aglutinamiento con composición de factor aglutinante de riñón de cerdo parcialmente purificada. Debido al color rojizo del extracto de aglutinante de folato de riñón de cerdo y como el aglutinante procedente de leche después de fraccionación de DEAE (dietilaminoetilcelulosa, una resina normal de intercambio aniónico) mostró fuerte absorberencia a 420 nm, se ensayó la posibilidad de que existiera hierro en el aglutinamiento mediante preparaciones de riñón de cerdo. A concentraciones que alcanzaban hasta $2,0 \times 10^{-6}$ M de o-fenantrolina, un agente de quelación del hierro, no se producía efecto alguno sobre la reacción de aglutinamiento. Mediante procedimientos de elución, el factor aglutinante del riñón de cerdo saturado y sin saturar mostró un peso molecular aparente de 35.000 a 40.000 daltons.

Según se ha indicado anteriormente, también se han observado factores aglutinantes de folato de gran agilidad en la leche de ganado vacuno, en el suero y leucocitos de pacientes con leucemia en suero normal y en suero deficiente de folato; además, se ha indicado que existe un factor aglutinante de folato de mas baja afinidad en el límite de la mucosa intestinal. Debido a las propiedades especiales descritas anteriormente y debido a la facilidad relativa y económica con que se puede obtener, el factor de aglutinante de folato de riñón de cerdo parece ofrecer el mejor material para fines de análisis y estudio y comparación con aglutinantes de folato procedentes de otras fuentes. Uno de los descubrimientos mas notables resultantes de este trabajo ha sido la detección de folato combinado en

5 el suero humano. Aunque es muy bajo en pacientes normales de tal forma que, en tales casos, se puede despreciar, la cantidad de folato combinado que tiene lugar en el suero humano de ensayo varía con el estado patológico del paciente y, por lo tanto, se puede usar como ayuda al diagnóstico. Por lo tanto, se puede sugerir que cualquiera que sea el método para analizar el folato del suero, tanto si es por el método descrito en la presente memoria, como por el método de Rothenberg, o el método de L. casei un análisis preciso debe tener en consideración la cantidad de folato combinado que tiene lugar en el suero del análisis.

10

15 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacer se constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

1ª.- Procedimiento de análisis radioisotópico competitivo para medir la concentración de folato en el suero, caracterizado porque comprende las etapas de:

5 a) relacionar radioisotópicamente las cantidades combinadas de folato radioactivado y un folato conocido, a varias concentraciones del folato conocido, en un primer sistema que contiene una cantidad predeterminada del folato radioactivo, una cantidad predeterminada de un factor aglutinante para
10 los folatos, y una cantidad predeterminada de suero de prueba desfolatado;

b) determinar radioisotópicamente la cantidad combinada de dicho folato radioactivado en un segundo sistema que contiene dicha cantidad predeterminada del folato radioactivo, el suero de la prueba, y dicha cantidad predeterminada del
15 factor aglutinante; y

c) correlacionar la cantidad combinada de folato radioactivado determinada en la fase (b) por la relación determinada en la fase (a) para calcular la cantidad de folato en el
20 suero.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el folato radioactivado y el folato conocido se mezclan entre sí antes de añadir el factor aglutinante.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la mezcla de folato radioactivado y el folato conocido se incuba por espacio de 30 a 60 minutos antes de
25 añadir el factor aglutinante.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el folato radioactivado y el folato conocido

en la etapa (a) y el folato radioactivado y el suero de la prueba en la etapa (b) se mezclan entre sí antes de añadir el factor aglutinante en cada una de dichas etapas.

5 5ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el suero desfolatado es suero humano normal de donantes.

6ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el suero desfolatado se desfolata por contacto con carbón activado.

10 7ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el suero de la prueba se desnaturaliza antes de la etapa (b) para remover aglutinantes de folato de suero.

15 8ª.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el suero de la prueba se desnaturaliza calentando el punto de ebullición del agua, se sedimenta, y el líquido sobrenadante se utiliza como suero de prueba.

9ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el factor aglutinante de folato es factor aglutinante de folato de riñón de cerdo.

20 10ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el folato radioactivado es ^3H -PGA.

11ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el folato conocido es $5\text{CH}_3\text{FH}_4$.

12a.- Procedimiento de análisis radioisotópico competitivo para medir la concentración de folato en el suero, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria y ilustrado en los adjuntos dibujos.

5

Esta Memoria consta de 34 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid 28 OCT. 1976

CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY.

Dr. F. Fernández L. García Fernández

