

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19 ES	21	NUMERO	439.520	20 A1
	22	FECHA DE PRESENTACION		
			17.7.75	

P.- 60.854  
JMT/SS/A 449

PATENTE DE INVENCION

29 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
32050/74	19.7.74	G. Bretaña

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N	

54 TITULO DE LA INVENCION
"UN METODO DE PREPARACION DE UN REACTIVO DE DIAGNOSTICO PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS MICROBIANOS ESPECIFICOS EN FLUIDOS CORPORALES"

71 SOLICITANTE (S)
THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED J

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
183-193 Euston Road, Londres, N.W.1., Inglaterra

72 INVENTOR (ES)
Stuart Millar Russell y Leonard William Jerome Bishop

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ

P.- 60.854

1                    Esta invención se refiere a un método para prepara  
rar un sistema para diagnosticar enfermedades microbianas  
en el hombre, animales y plantas y en particular para medir  
la cantidad de anticuerpos producidos como resultado de las  
5                    mismas.

                  El método más comúnmente usado para el diagnóstico  
de ciertos tipos de enfermedades producidas por virus es  
el "ensayo de inhibición de la hemaglutinación (I.H.)". Es  
te ensayo tiene la desventaja de que depende del hecho de  
10                   que ciertos virus sólo pueden aglutinar determinados tipos  
de eritrocitos, por ejemplos los virus de la influenza, de  
la parotiditis y de la parainfluenza aglutinan eritrocitos  
de pollo, del hombre y del cobaya, los adenovirus, eritro-  
citos de la rata y del mono, y los reovirus y muchos ente-  
15                   rovirus sólo eritrocitos del hombre. El ensayo se efectúa  
mezclando virus con los eritrocitos apropiados en presen-  
cia de suero del paciente, es decir el fluido que se produ-  
ce cuando la sangre coagula formando un grumo. Si en el  
suero se encuentran presentes anticuerpos para el virus, el  
20                   virus será incapaz de aglutinar las células. El ensayo de  
inhibición de la hemaglutinación tiene la desventaja adi-  
cional de que es tedioso y no exacto, por lo que es neces-  
ario usar series de dilución que se duplican, con la consi-  
guiente pérdida de exactitud, lo que hace imposible detec-  
25                   tar pequeñas diferencias en el título de anticuerpos. Ade-  
más, los sueros deben ser tratados previamente para elimi-  
nar los inhibidores no específicos que evitan que el virus  
se una a los eritrocitos y por consiguiente den como resul-  
tado una falsa lectura positiva del ensayo.

30                   Recientemente ha sido propuesto un nuevo ensayo

1 para detectar anticuerpos para el virus de la influenza,  
llamado el "ensayo de difusión radial sencillo", por Schild  
y otros (Symp. Series Immunobiol. Standard, Vol. 20, pp.  
39-46) en el que el virus de la influenza apropiado (67 a  
5 100 µg de partículas de virus purificado/ml de gel) se in-  
corpora a gel de agarosa. Cuando el gel ha solidificado se  
cortan cavidades circulares y el suero del paciente o del  
animal que ha de ser ensayado se introduce en las cavi-  
10 des. La presencia en el suero de ensayo de anticuerpos pa-  
ra los virus se detecta por la aparición de zonas de opales-  
cencia que rodean a las cavidades. La opalescencia es oca-  
sionada por la difracción de la luz debida a un halo de mo-  
léculas de anticuerpo que rodean a cada partícula de virus.

15 El ensayo de difusión radial sencillo tiene me-  
jor resolución que el método de I.H. y es más rápido de lle-  
var a cabo. No obstante, tiene la desventaja de que la pre-  
paración de virus de la influenza usada para este propósito  
ha de ser purificada y estar muy concentrada en el gel, lo  
que hace que el ensayo sea costoso. Adicionalmente, se ne-  
20 cesitan cantidades grandes de virus para el ensayo.

Se ha encontrado en la actualidad que incorpo-  
rando en un gel eritrocitos, que poseen partículas micro-  
bianas que se adhieren a su superficie, dejando que una -  
muestra de fluido corporal que puede contener anticuerpos  
25 específicos para el microbio se difunda en el gel, introdu-  
ciendo un complemento en el sistema, que es fijo, es decir  
se combina, cuando anticuerpos específicos han interaccio-  
nado con las partículas microbianas, dará como resultado  
una zona circular visible de lisis, cuyo tamaño depende de  
30 la cantidad de anticuerpos presentes. La lisis es la rotura

1 de un eritrocito con la liberación resultante de hemoglobi-  
na.

Según la presente invención, en un aspecto, por  
consiguiente, se proporciona un sistema para detectar la  
5 presencia de anticuerpos microbianos específicos en fluidos  
corporales tales como sangre, suero, plasma, secreciones  
nasales, fluido cerebroespinal, saliva o leche, que com-  
prende un gel que contiene eritrocitos intactos que poseen  
partículas microbianas apropiadas que se adhieren a la su-  
10 perficie de los mismos. En particular el sistema como se  
ha definido anteriormente, comprende también un complemen-  
to.

El gel que se usa está constituido preferiblemen-  
te por 0,5 a 2,0% de agarosa, pero puede usarse alternati-  
15 vamente ágar, gelatina o cualquier matriz adecuada que per-  
mita la difusión y no tenga actividad anti-complemento. La  
concentración del gel debe ser de preferencia lo suficien-  
temente alta para que sea fácil de manejar, pero no tan con-  
centrada que no pueda tener lugar la difusión.

20 Los eritrocitos pueden ser obtenidos mediante  
punción en la vena de un animal vertebrado y recogidos en  
un medio que eviten la coagulación. Pueden ser usados de  
modo adecuado diversos tipos de eritrocitos para los pro-  
pósitos de la presente invención, por ejemplo pueden ser  
25 usados eritrocitos de bovino con ciertos virus. Sin embar-  
go, habitualmente se usan eritrocitos de oveja a pesar de  
que tienen la desventaja de poseer sobre su superficie el  
antígeno de eritrocitos de Forssman y por consiguiente, el  
fluido que ha de ser ensayado puede ser tratado, antes del  
30 ensayo, con eritrocitos de oveja a 37°C durante 30 minutos

1 con objeto de absorber anticuerpos para el antígeno de Forssman.

Otros tipos pueden ser preferidos en asociación con microorganismos particulares, por ejemplo, cuando se usan virus del sarampión, son habitualmente muy convenientes y preferidos eritrocitos de mono Patas, aunque ciertos eritrocitos pueden ser demasiado frágiles o mayores de lo necesario, dando lugar a zonas de lisis menos definidas. Por almacenamiento, los eritrocitos tienden a hacerse más frágiles con la edad y más susceptibles a la lisis espontánea, por consiguiente, con objeto de prolongar la "vida" de los eritrocitos, pueden incorporarse en el gel sustancias químicas, con objeto de estabilizar las células. Alternativamente, los eritrocitos pueden ser tratados previamente con una sustancia química tal como el glutaraldehído, con objeto de estabilizarlos.

Otro método de "prolongar la vida" de los eritrocitos consiste en incorporar dimetilsulfóxido (DMSO) en el gel en la fase de vertido y después congelar el gel en nitrógeno líquido con el vapor anterior. Incorporando aproximadamente 10% de DMSO se mantiene la integridad del gel.

Si las partículas microbianas que han de ser usadas en el sistema son virus, entonces éstos pueden ser preparados mediante técnicas convencionales a partir de cultivo en animales, huevos o tejidos, (véase por ejemplo, "Textbook of Virology" por A.J. Rhodes y C.E. Van Rooyan, 5ª Edición, publicado por Williams and Wilkins, Baltimore, EE.UU. 1968).

Con ciertos tipos de virus los eritrocitos requieren un tratamiento preliminar con una sustancia química que

1 favorezca la fijación de las partículas de virus a la super-  
ficie de los eritrocitos, por ejemplo, el virus de la in-  
fluenza puede aglutinar eritrocitos pero ésto va seguido de  
5 elución a 37°C, es decir, las partículas de virus se despre-  
nderán pronto de los eritrocitos espontáneamente, debido a  
la acción de la enzima viral neuraminidasa sobre los recep-  
tores eritrocitos. Con objeto de asegurar que el virus de  
la influenza quede unido permanentemente a los eritrocitos,  
éstos pueden ser tratados preliminarmente con solución de  
10 peryodato de potasio, cuya concentración dependerá de las  
especies de eritrocitos usadas y variará desde 1,25 a 5,5  
 $\times 10^{-4}$  M. Esto da como resultado la formación de aldehido  
o grupos modificados de modo semejante, sobre la superficie  
de los eritrocitos, y evita la acción de la neuriminidasa.  
15 Con otros tipos de virus; por ejemplo de la rubeola, puede  
no ser necesario el tratamiento preliminar de los eritroci-  
tos con peryodato o cualquier otro agente químico tal como  
cloruro crómico o carbodiimida.

20 Ciertos microorganismos pueden no adherirse di-  
rectamente a los eritrocitos y en tales casos puede ser po-  
sible fijar el organismo al eritrocito indirectamente, usan-  
do compuestos que posean afinidad para los eritrocitos, ta-  
les como lectinas o lipopolisacáridos.

25 El complemento, que en un tipo particular del  
sistema ya está incorporado en el gel, comprende un grupo  
complejo de proteínas séricas, la mayor parte de las cuales  
tienen la característica de interaccionar con moléculas de  
anticuerpo una vez que éstas se han combinado con un anti-  
geno, siendo el efecto de tal combinación provocar la lisis  
30 cuando el antígeno correspondiente es una célula tal como

1 un eritrocito. El complemento requerido para el propósito  
de la presente invención es convenientemente, un complemen-  
to de un vertebrado que preferiblemente, puede ser obtenido  
comercialmente de Wellcome Reagents Ltd. o puede ser prepa-  
5 rado dejando coagular sangre, separando el suero y guardán-  
dolo a 4°C o a una temperatura inferior, de preferencia a  
-20°C. Se incorpora al sistema en cantidad suficiente para  
asegurar la lisis.

10 El complemento puede ser preparado también para  
incorporar en el sistema, por ejemplo en un vial hermética-  
mente cerrado de vidrio o plástico, junto con instrucciones  
apropiadas para usar con el gel. Además, es conveniente  
proporcionar dos viales más, herméticamente cerrados y este-  
rilizados, que contengan sueros de referencia, uno de los  
15 cuales contiene anticuerpos para el microorganismo que ha  
sido incorporado al sistema, y estando desprovisto el otro  
de tales anticuerpos. Todos estos componentes del sistema,  
esenciales y opcionales; para ensayar fluidos corporales  
y detectar anticuerpos microbianos específicos, pueden pre-  
20 sentarse y envasarse en una caja o recipiente, junto con  
instrucciones para su uso. Por consiguiente, puede hacerse  
hincapié de que tal presentación del sistema, que comprende  
la composición de gel, el complemento y las instrucciones,  
así como también otros componentes y coadyuvantes opciona-  
25 les, se considera comprendida dentro del alcance de la pre-  
sente invención y, por consiguiente, se proporciona un equi-  
po de ensayo.

30 El sistema puede adaptarse para detectar una cla-  
se de anticuerpo, por ejemplo, IgG, empleando, además de un  
gel que incorpora el microbio específico, un gel que incor-

1       pora suero anti-IgG. La zona producida por IgG puede evi-  
tarse por tanto, incorporando en el sistema el suero de  
anti-inmunoglobulina.

5       Alternativamente, se recorta una cavidad en el  
centro del gel, en la cual se coloca el fluido de ensayo y  
a cierta distancia de ella se recorta otra cavidad en la  
cual se deposita el suero anti-IgG. El gel se incuba per-  
mitiendo que se desarrolle una zona de lisis y cuando se  
10       presenta una zona de no hemolisis, en el borde de la zona  
de hemolisis cerca de la cavidad adyacente, esto muestra  
que los anticuerpos de IgG estaban presentes en el fluido  
de ensayo y por tanto habían sido neutralizados.

15       Por consiguiente, en otro aspecto particular adi-  
cional el sistema puede comprender una composición según se  
ha definido anteriormente, y también una cantidad eficaz de  
un suero anti-inmunoglobulina.

20       Tales sueros anti-inmunoglobulina, pueden ser  
obtenidos comercialmente de Wellcome Reagents Ltd, o puri-  
ficando sueros procedentes de pacientes con mieloma, por  
ejemplo sobre DEAE-celulosa, con objeto de eliminar las in-  
munoglobulinas indeseadas, añadiendo coadyuvantes e inyec-  
tando en animales. Se extrae sangre de los animales poste-  
riormente y se separa el suero, que puede ser usado para  
incorporar en el gel.

25       El sistema puede adaptarse también para detec-  
tar antígenos particulares de hemaglutinina y neuraminida-  
sa en partículas del virus de la influenza, usando diver-  
sas cepas recombinantes de virus de la influenza.

30       El recipiente en que se vierte el gel comprende  
convenientemente, una placa de plástico o vidrio que tiene

1 un hueco rectangular plano adecuado para contener la capa  
de gel, y una placa rectangular, transparente, y plana de  
vidrio o plástico que puede ser colocada sobre la placa con  
el hueco, con objeto de mantener el gel húmedo, estéril y  
5 evitar la evaporación. Alternativamente, puede ser usada  
una bandeja de Petri o cualquier recipiente adecuado, en tan-  
to que el espesor del sistema no sea inferior a aproximada-  
mente 0,1 mm y no sea mayor de 5 mm. Además, el gel debe  
tener un espesor uniforme.

10 Los recipientes usados se envasan normalmente  
en condiciones estériles y por tanto no necesitan tratamien-  
to esterilizante adicional. Con objeto de evitar el creci-  
miento indeseado de bacterias u hongos sobre el gel termi-  
nado, se incorpora en el gel un agente bactericida y fungi-  
15 cida tal como azida de sodio o Mertiolato. Por tanto, la  
azida de sodio tiene la propiedad de prolongar la vida de  
almacenamiento del complemento si éste se incorpora en el  
gel.

20 La muestra de fluido corporal para ensayar con  
el sistema que ha sido descrito en esta Memoria, puede obte-  
nerse del paciente o animal mediante diversos métodos dife-  
rentes que dependen del líquido particular que haya de tra-  
tarse. Por ejemplo, puede obtenerse sangre mediante punción  
venosa. Si ha de usarse suero para el ensayo, se calienta  
25 preferiblemente a 56°C y se mantiene en esta temperatura du-  
rante 30 minutos con objeto de separar el complemento pre-  
sente. Las muestras pueden ser aplicadas al gel o bien por  
deposición en una cavidad cortada del gel, o por adsorción  
sobre un círculo de papel de filtro que tenga un diámetro  
30 de 4-5 mm, que a su vez se coloca sobre la superficie del

1 gel.

5 Cuando se encuentran presentes en la muestra de fluido anticuerpos microbianos específicos, se produce una zona de lisis circular y visible, siempre que el complemento esté ya presente en el gel o se introduzca a continuación del fluido, el tamaño de la cual está directamente relacionado con el logaritmo del título de anticuerpos.

10 En un segundo aspecto de la invención se proporciona un método para detectar la presencia de anticuerpos microbianos en fluidos biológicos que comprende aplicar una muestra de fluido corporal, tal como sangre, suero, plasma, secreciones nasales, fluido cerebroespinal, saliva o leche procedente de un paciente o animal, a un sistema de diagnóstico, como se ha definido anteriormente en la Memoria, 15 dejar que el fluido se difunda en el gel y reaccione con los componentes del sistema que incluyen también un complemento, o introducir el complemento en el gel, para proporcionar una zona visible de lisis de eritrocitos que corresponde a la cantidad de anticuerpos microbianos en el fluido corporal. 20

25 El método de detección de anticuerpos microbianos descrito puede ser usado para diagnosticar muchas enfermedades, por ejemplo enfermedades producidas por virus, tales como influenza, ambas A y B, rubeola, sarampión, parainfluenza, citomegalovirus y "louping ill". El ensayo es especialmente útil para detectar aquellas personas o animales que no tienen inmunidad o que tienen niveles bajos de inmunidad con respecto a una enfermedad particular, y por tanto están en peligro y necesitan vacunación. El ensayo 30 también puede ser usado para diagnosticar enfermedades pro-

1 ducidas por virus en plantas. Se inyecta una preparación  
del tejido de la planta enferma en un animal, y después de  
un período de tiempo se extrae del animal y se usa en el en  
sayo, suero que contiene anticuerpos para el virus de la  
5 planta. El ensayo puede ser usado asimismo para detectar  
anticuerpos para psittacosis, Mycoplasma y también bacte-  
rias.

Las ventajas de este método en el campo de los  
virus sobre los métodos usados con anterioridad, residen en  
10 que es rápido, sencillo y fácil de efectuar, y que es muy  
específico, ya que puede distinguir entre antisueros para  
cepas de un virus estrechamente relacionadas, en particular  
cepas de virus de la influenza, e incluso puede diferenciar  
entre una infección primaria y una infección secundaria. La  
15 ventaja del sistema proporcionado por la invención es que,  
en comparación con la técnica de Schild, puede no necesi-  
tarse purificación o concentración del virus y puede ser -  
usada en realidad con fluido alantóico crudo del virus de  
la influenza. Además el área visible de la lisis proporció  
20 na niveles de anticuerpos con una exactitud de 5 a 20%.

A continuación con referencia al dibujo que se  
acompaña se describe una placa de Hyland adecuada para con-  
tener el gel según la invención. La placa de Hyland 2, com  
prende una base rectangular plana 4, y una tapa 6, ambas de  
25 un material plástico transparente. La base 4 tiene un hue-  
co rectangular 8, en el que se vierte un gel 10. Se cortan  
cavidades 12 del gel 10, con objeto de recibir las muestras  
de los fluidos corporales. La tapa 6 se ajusta hermética-  
mente sobre la base 4 para proteger el gel del secado y el  
30 daño físico. La tapa 6 está circundada por un reborde 14

1 que se ajusta en un labio que rodea a la base 4.

La invención será descrita a continuación con referencia a los Ejemplos siguientes, pero de ningún modo debe considerarse limitada por los mismos.

5

Ejemplo 1.

Se mezclaron volúmenes iguales de eritrocitos de oveja empaquetados y lavados y una solución  $5,5 \times 10^{-4}M$  de peryodato potásico en solución salina, y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió fluido alantóico, procedente de huevos de pollo, que contenía cepa A2 de virus de la influenza (título de hemaglutinación aproximadamente  $4 \times 10^3/ml$ ), siendo el volumen del fluido diez veces el de los eritrocitos empaquetados. Se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos, los eritrocitos recubiertos se lavaron después tres veces en solución salina tamponada con Barbitona, es decir solución salina que contenía barbitona y tamponada a pH 7,2, para eliminar los virus libres no unidos a los eritrocitos, y finalmente se preparó una suspensión al 50% v/v en solución salina tamponada.

Se preparó Agarosa al 1% en solución salina tamponada con Barbitona, y una parte alícuota (1,5 ml) de la misma se vertió en una placa de Hyland para formar una capa base (1 mm de espesor). Una muestra (100  $\mu l$ ) de la suspensión de eritrocitos al 50% se mezcló con agarosa (1,5 ml) a  $45^{\circ}C$  y la suspensión resultante se vertió sobre la capa de base y se dejó solidificar para formar un sistema de ensayo que tenía un espesor uniforme (2 mm).

30

1 Ejemplo 2

La suspensión de eritrocitos (al 50% v/v recubierto con virus) fue preparada como en el Ejemplo 1. Una porción (100 µl) de ésta se añadió a agarosa (3 ml) y a -  
5 ello se añadió una solución de complemento de cobaya (100 µl de título hemolítico 1:160) que puede adquirirse de Wellcome Reagents Ltd. La suspensión resultante se vertió en una placa de Hyland y se dejó solidificar para dar una capa uniforme (2 mm de espesor).

10 Ejemplo 3

Se preparó una solución de agarosa al 1% en solución salina tamponada con Barbitona y se añadió suficiente azida de sodio para dar una solución al 0,1%. Se preparó después como en el Ejemplo 2, una suspensión que contenía eritrocitos recubiertos con virus, y complemento de cobaya, usando la solución de agarosa y entonces se vertió una parte alícuota ( 3ml). en una placa de Hyland.

20 Ejemplo 4

Se preparó una suspensión de eritrocitos recubiertos con virus como en el Ejemplo 1. Después de dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos, los eritrocitos fueron lavados una vez, y después se trató 1 ml de los eritrocitos empaquetados con 0,5 ml de solución de glutaraldehído al 1% durante 7 1/2 minutos. Los eritrocitos se lavaron después cuatro veces para eliminar el exceso de glutaraldehído y se preparó entonces una placa de gel según se ha descrito en el Ejemplo 1.

1 Ejemplo 5

5 Se preparó un gel como en el Ejemplo 1, con la excepción de que el virus usado era la cepa Thomas, cultivada en BHK, de rubeola (título de hemaglutinación aproximadamente 1024/ml). Los eritrocitos y los virus de la rubeola se dejaron en reposo durante 1 hora a 4°C para permitir la adsorción. Además se incorporó en el gel de agarosa azida de sodio al 0,1%.

10 Una muestra de sangre de paciente se colocó sobre una zona de papel de filtro (Whatman) en cantidad suficiente para proporcionar discos (4 mm de diámetro) cortados de ella que contenían cada uno  $2,3 \times 10^{-2}$  ml de sangre adsorbidos sobre ellos. Los discos humedecidos con sangre se colocaron después sobre el gel a 4°C durante la noche y se  
15 incubó a 37°C durante 3 horas, al cabo de cuyo tiempo las zonas de lisis bajo cada disco de papel de filtro indicaron que el paciente tenía en su sangre anticuerpos para la rubeola.

20 Ejemplo 6

25 Se preparó un gel como en el Ejemplo 1, con la excepción de que el virus usado era de "louping ill" (Título de hemaglutinación 1:256). Los eritrocitos se trataron con un volumen igual de peryodato de potasio  $10^{-3}$ M antes de dejarlos estar con el virus durante 45 minutos a 4°C para permitir la adsorción. Después se llevó a cabo el procedimiento normal para la preparación de la placa, según se ha descrito en el Ejemplo 1.

30

1     Ejemplo 7

5             Se preparó un gel como en el Ejemplo 1, con la  
excepción de que los eritrocitos usados eran de mono Patas  
y el virus usado era virus del sarampión (título de hemaglu-  
tinación 1:1024). Los eritrocitos de mono Patas se trata-  
ron con un volumen igual de peryodato de potasio  $10^{-3}M$  an-  
tes de dejarlos en reposo con el virus, durante 15 minutos  
a 37°C. Después se llevó a cabo el procedimiento normal  
para preparar la placa, según se ha descrito en el Ejemplo  
10     1.

15     Ejemplo 8

Se preparó un gel como en el Ejemplo 1, con la  
excepción de que el microorganismo usado era Psittacosis  
(título de fijación de complemento 1:64). Los eritrocitos  
y los organismos Psittacosis fueron dejados en reposo du-  
rante 1 hora para permitir la adsorción. Se llevó a cabo  
después el procedimiento normal para preparar la placa, se-  
gún se ha descrito en el Ejemplo 1.

20     Ejemplo 9

25             Se preparó un gel como en el Ejemplo 1, con la  
excepción de que el microorganismo usado fue Mycoplasma ga-  
llisepticum (título de hemaglutinación 1:64). Los eritro-  
citos tratados con peryodato se mezclaron con 2,0 ml de di-  
lución 1 en 5, sometida a la acción de ondas sonoras, de  
la preparación de Mycoplasma y se dejó en reposo durante  
20 minutos. Se llevó a cabo después el procedimiento nor-  
mal para la preparación de la placa, según se ha descrito  
30     en el Ejemplo 1.

1 Ejemplo 10

Se preparó un gel como en el Ejemplo 1, con la excepción de que el microorganismo usado fue Bordetella pertussis. Se dejaron en reposo los eritrocitos y los organismos de Bordetella a 4°C, durante una hora agitando intermitentemente, para permitir la adsorción. Además, se incorporó al gel de agarosa, azida de sodio al 1%. Se llevó a cabo después el procedimiento normal para la preparación de la placa, según se ha descrito en el Ejemplo 1.

10

Ejemplo 11

Se preparó un gel como en el Ejemplo 10 con la excepción de que el microorganismo usado era Vibrio Cholerae Inaba.

15

Ejemplo 12

Un paciente que se sospechaba sufría de influenza cepa A2, proporcionó muestras de sangre.

20

Se preparó un sistema de ensayo como en los Ejemplos 1, 2 y 3 y se cortaron por punzonamiento cavidades (3 mm de diámetro). A cada cavidad se añadió una parte alícuota (10 µl) del fluido corporal en ensayo, por ejemplo suero, que previamente había sido calentado a 56°C y mantenido a dicha temperatura durante 30 minutos con objeto de inactivarlo. El sistema se mantuvo durante la noche en una caja húmeda a una temperatura reducida (4°C) con objeto de permitir que la difusión se completara. Después de la difusión el sistema se cubrió con una solución de complemento de cobbya (1 ml de una preparación liofilizada que puede obtenerse de Wellcome Reagents Ltd. y reconstituirse con agua des-

30

1 tilada, según las instrucciones que figuran en el recipiente) y después se incubó (37°C) hasta que se desarrollaron zonas de lisis (2-3 horas), lo que indicó que el paciente  
5 sistema se lavó entonces para eliminar el complemento y liberar hemoglobina, y finalmente se fijó en solución salina con formol (10%) con propósitos de almacenamiento y referencia. Los diámetros de las zonas de lisis producida fueron medidos después y comparados con zonas de referencia  
10 calibradas.

#### Ejemplo 13

15 Se preparó un gel como en el Ejemplo 2, con la excepción de que el virus usado era de rubeola, y se cortó una cavidad (3 mm de diámetro) en el centro. Se cortaron otras dos cavidades más a distancias iguales desde la cavidad central. En la cavidad central se puso una parte alícuota (10 µl) del fluido de ensayo, y en las otras dos cavidades se depositó un volumen (10 µl) de anti-suero IgG.

20 El gel se incubó hasta que se desarrollaron zonas de lisis. Las zonas de lisis fueron examinadas, y la parte de la zona más cercana a la cavidad con IgG y la porción de media luna apuntando hacia la cavidad con el fluido de ensayo, sin hemolisis visible, mostraron que se encontraban presentes moléculas de inmunoglobulina IgG en el fluido  
25 de ensayo y habían sido neutralizadas.

#### Ejemplo 14

30 Un equipo para usar en el diagnóstico de la cepa A2 de la influenza, o para detectar la presencia de anti

1 cuerpos para influenza A2 está compuesto por dos viales que  
contienen cada uno de ellos una preparación liofilizada de  
suero de referencia, uno de cuyos sueros contiene anticuer-  
5 pos específicos para la influenza A2 y el otro no. También  
forman parte del equipo placas Hyland que contienen el sis-  
tema según se ha preparado en el Ejemplo 1 ó 4, junto con  
instrucciones para el uso, conforme se indica en el Ejemplo  
5.

10 Ejemplo 15

Un equipo para usar en el diagnóstico de la ce-  
pa de la influenza A2 o para detectar la presencia de anti-  
cuerpos para la influenza A2, está compuesto de dos viales  
cada uno de los cuales contiene una preparación liofilizada  
15 de suero de referencia, conteniendo uno de ellos anticuer-  
pos específicos para la influenza A2 y el otro no, junto  
con placas de Hyland que contienen el sistema preparado co-  
mo en cualquiera de los Ejemplos 2, 3 ó 4, junto con ins-  
trucciones para su uso.

20

REIVINDICACIONES

25

Los puntos de invención propia y nueva que se  
30 presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente

1 de Invención en España, por VEINTE años, son los que se re-  
cogen en las reivindicaciones siguientes:

1<sup>a</sup>.- Un método de preparación de un reactivo de  
diagnóstico para detectar la presencia de anticuerpos micro-  
5 bianos específicos en fluidos corporales, que comprende mez-  
clar eritrocitos intactos con partículas microbianas apro-  
piadas, e incorporar la suspensión resultante en un gel.

2<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en  
el que los eritrocitos se tratan previamente con un agente  
10 de unión.

3<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 2<sup>a</sup>, en  
el que el agente de unión es una lectina o un lipo-polisa-  
cárido.

4<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en  
15 el que los eritrocitos se tratan previamente con una sus-  
tancia que favorece la adherencia de las partículas micro-  
bianas a los eritrocitos.

5<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 4<sup>a</sup>, en  
el que la sustancia es peryodato de potasio, cloruro crómi-  
20 co o carbodiimida.

6<sup>a</sup>.- Un método según una cualquiera de las rei-  
vindicaciones 1<sup>a</sup> a 5<sup>a</sup>, que comprende la etapa adicional de  
mezclar un complemento en el gel.

7<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 6<sup>a</sup>, en  
25 el que el complemento es de cobaya.

8<sup>a</sup>.- Un método según las reivindicaciones 6<sup>a</sup> ó  
7<sup>a</sup>, en el que el complemento se incorpora en el gel en can-  
tidad suficiente para asegurar la lisis de los eritrocitos.

9<sup>a</sup>.- Un método según una cualquiera de las rei-  
30 vindicaciones 1<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup>, en el que el gel comprende de 0,5 a

1 2% de agarosa.

10<sup>a</sup>.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 9<sup>a</sup>, en el que la concentración de eritrocitos, que poseen partículas microbianas que se adhieren a su superficie, incorporada en el gel, es de 0,5 a 5,0%.

11<sup>a</sup>.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup>, en el que los eritrocitos son eritrocitos de bovino.

12<sup>a</sup>.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup>, en el que los eritrocitos son de oveja.

13<sup>a</sup>.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup>, en el que los eritrocitos son de mono Patas.

14<sup>a</sup>.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 13<sup>a</sup>, que comprende la etapa adicional de incorporar en el gel un agente de conservación para los eritrocitos.

15<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 14<sup>a</sup>, en el que el agente de conservación es glutaraldehído ó dimetilsulfóxido.

16<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 15<sup>a</sup>, en el que el glutaraldehído se incorpora en el gel en una concentración de 0,5 a 2%.

17<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 15<sup>a</sup>, en el que el dimetilsulfóxido se incorpora en el gel de una concentración de 0,5 a 20%.

18<sup>a</sup>.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 17<sup>a</sup>, que comprende la etapa adicional de incorporar en el gel un agente bactericida y/o fungicida.

- 1                    19<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 18<sup>a</sup>, en el que el agente bactericida y/o fungicida es azida de sodio o Mertiolato.
- 5                    20<sup>a</sup>.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 18<sup>a</sup>, en el que las partículas microbianas son virus.
- 21<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 20<sup>a</sup>, en el que el virus es virus del sarampión.
- 10                   22<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 20<sup>a</sup>, en el que el virus es virus de la influenza.
- 23<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 20<sup>a</sup>, en el que el virus es virus de la rubeola.
- 24<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 20<sup>a</sup>, en el que el virus es citomegalovirus.
- 15                   25<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que se mezclan eritrocitos de oveja con virus de la influenza.
- 26<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que se mezclan eritrocitos de oveja con virus de la rubeola.
- 20                   27<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que se mezclan eritrocitos de mono Patas con virus del sarampión.
- 28<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que las partículas microbianas son bacterias.
- 25                   29<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 28<sup>a</sup>, en el que las bacterias son Vibrio cholerae.
- 30<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 28<sup>a</sup>, en el que las bacterias son Bordetella pertussis.
- 30                   31<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en

1 el que las partículas microbianas son micoplasmas.

32<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que las partículas microbianas son organismos Psittacosis.

5 33<sup>a</sup>.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 32<sup>a</sup>, que comprende la etapa adicional de mezclar en el gel suero anti-inmunoglobulina.

34<sup>a</sup>.- Un método según la reivindicación 33<sup>a</sup>, en el que el suero anti-inmunoglobulina es anti-IgG.

10 35<sup>a</sup>.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 34<sup>a</sup>, que comprende la etapa adicional de verter el gel fundido en un recipiente encerrado para formar en él una capa delgada.

15 36<sup>a</sup>.- Un método de preparación de un reactivo de diagnóstico para detectar la presencia de anticuerpos microbianos específicos en fluidos corporales.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

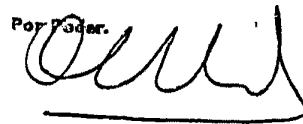
20 Esta Memoria consta de veintidós hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 21 JUN 1973

P.A.

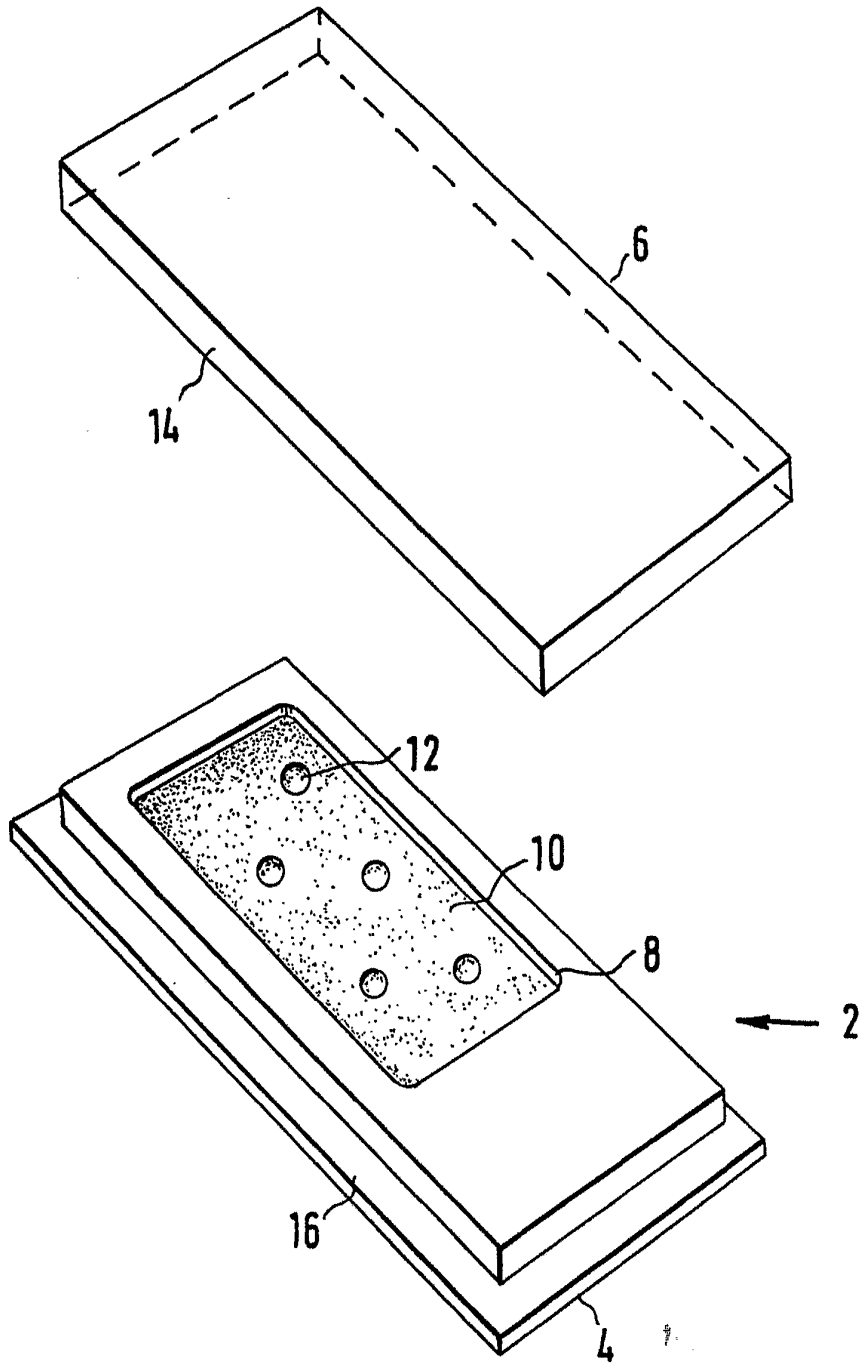
Alberto de Eizaburu

Por Poder.



25

30



Albert de Elmhurst  
per 2000