

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19 ES	21	NUMERO	A1
	21	448.571	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		4-6-1976	

PATENTE DE INVENCION

P.- 63.200

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
P 25 25 804.2	10-6-75	Rep.Fed.Alemana

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K G01N	

64 TITULO DE LA INVENCION
"PROCEDIMIENTO PARA LA ESTABILIZACION DEL FACTOR DE AGLUTINACION LIGADO A MICROORGANISMOS"

71 SOLICITANTE (S)
BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Marburg/Lahn, República Federal Alemana

72 INVENTOR (ES)
Dr. Norbert Heimbürger, Friedrich Brauns y Kurt Fischer.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON ALBERTO DE MIZABURU MARQUEZ

LFG

P.-63.200

1 La invención se refiere a un factor de aglutina-
ción (factor Clumping) estable, apto para ser almacenado,
adecuado como reactivo para el reconocimiento de productos
de desdoblamiento de fibrinógeno y de fibrina, así como a
5 un procedimiento para su preparación.

 La activación del sistema fibrinolítico conduce
a una degradación proteolítica de fibrinógeno o de fibrina.
En la degradación del fibrinógeno se forman primero el lla-
mado fragmento X y otros productos de desdoblamiento, que
10 son designados por A, B y C. El fragmento X muestra en mag-
nitud y en propiedades la más intensa semejanza con el fi-
brinógeno, y se puede llevar lentamente a coagulación con
trombina. Al proseguir la degradación proteolítica del frag-
mento X se forman los fragmentos Y y D. El fragmento Y ya
15 no se puede llevar a la coagulación con trombina. Una pro-
teólisis más avanzada del fragmento Y conduce a los produc-
tos de desdoblamiento D y E. Los productos de desdoblamiento
más pequeños D y E ya no tienen todos los determinantes
antígenos del fibrinógeno. Los productos de desdoblamiento
20 de fibrina son indicadores de determinadas enfermedades, y
parcialmente inhibidores de la formación de fibrina, por lo
que existe un interés clínico en determinar el contenido de
productos de desdoblamiento de fibrinógeno y/o de fibrina,
y con ello la extensión de una fibrinólisis intravascular.

25 El fundamento de un procedimiento para la deter-
minación de los productos de desdoblamiento mencionados con-
siste en que ciertos microorganismos, es especial cepas de
estafilococos, reaccionan con fibrinógeno y con los produc-
tos de desdoblamiento de fibrina X e Y, con aglutinación
30 macroscópica visible. La propiedad de aglutinación de los

1 estafilococos es atribuida a una enzima ligada a las célu-
las, que sólo está insuficientemente caracterizada. Se la
designa como "factor de aglutinación" o "factor Clumping".
A veces se entiende también por ello la coagulasa ligada a
5 las células. La posibilidad de rápida realización y la ele-
vada sensibilidad del sistema de ensayo basado en el fac-
tor de aglutinación, en especial para la determinación de
los productos de desdoblamiento de fibrina X e Y, hace a
este sistema de ensayo especialmente adecuado para el diag-
10 nóstico rutinario de la fibrinólisis.

No obstante, se ha puesto de manifiesto que las
suspensiones de estafilococos adecuados, preparadas según
la situación actual de la técnica, sólo tienen la necesaria
actividad para el reconocimiento de los productos de desdo-
15 blamiento de fibrina durante pocas horas, y que los produc-
tos liofilizados con fines de conservación de la actividad,
con frecuencia ya no se pueden suspender homogéneamente en
solución, o se aglutinan de modo no específico. La sensibi-
lidad de las bacterias vueltas a suspender disminuye rápi-
20 damente. Al cabo de pocas horas éstas son inapropiadas co-
mo reactivo para el reconocimiento de productos de desdo-
blamiento de fibrina.

Se ha encontrado ahora que microorganismos posi-
tivos frente al factor de aglutinación, en especial estafi-
25 lococos, que están suspendidos en una solución acuosa tam-
ponada de un alcohol plurivalente, no pierden su propiedad
de aglutinarse en presencia de productos de desdoblamiento
de fibrinógeno y/o de fibrina, incluso después de un alma-
cenamiento durante meses a temperaturas inferiores a +25°C.

30 Por consiguiente, es objeto de la invención una

1 suspensión homogénea de microorganismos muertos, positivos
frente al factor de aglutinación, de preferencia estafilo-
cocos, en una solución acuosa tamponada con valor de pH
7,0 a 7,7, que contiene disuelto en ella un alcohol pluri-
5 valente en una concentración de 3 - 50 % .

Para el sistema de ensayo en consideración se describió ya con frecuencia la utilización de *Staphylococcus aureus* Newman D₂C. La cepa consiste en una variante soluble, negativa frente a coagulasa y positiva frente al factor de aglutinación, de la cepa Newman, que fue seleccionada por E.S. Duthie, Southampton, con vistas a la formación del factor de aglutinación, a partir de cultivos del *Staphylococcus aureus* Newman, registrado en la National Collection of Type Cultures bajo el número 8178.

15 Cepas positivas frente al factor de aglutinación, que además son capaces de formar coagulasa soluble, pueden utilizarse asimismo, como es conocido por la bibliografía, para la determinación de productos de desdoblamiento de fibrina, si la coagulasa soluble se destruye, por ejemplo,
20 por una etapa de calentamiento. Los estafilococos tratados previamente de este modo pueden ser asimismo estabilizados según la invención. Resultados especialmente favorables respecto a la sensibilidad y estabilidad del reactivo para el reconocimiento de fibrinógeno y de productos de desdoblamiento de fibrina, los proporciona un *Staphylococcus aureus*
25 con la designación I.J.7, registrado en la American Type Culture Collection bajo el número ATCC 31153, cuya morfología puede ser descrita del modo siguiente:

30 La cepa fue originalmente aislada de una porción de faringe humana, retirada por frote y fue seleccionada en

1 relación con la formación de coagulasa ligada a las células.
 En medios nutricios líquidos, la cepa crece en pequeños gru-
 pos o por pares, con una proporción de hasta aproximadamente
 30% como colonias de células individuales. La cepa se colo-
 5 rea con los colorantes de anilina habituales. Es gram-posi-
 tiva.

Las características del *Staphylococcus aureus*
 I.J.7, sobre los siguientes medios nutricios sólidos, son:

10	para el aislamiento (24 horas, 37°C)	para la iden- tificación (24 horas, 37°C)
15	Staphylococcus Medium 110 (Baltimore Biological Lab.)	Buen crecimiento. Co- lonias amarillentas con aproximadamente 1 mm de diámetro
	Sangre de caballo-agar	Buen crecimiento. Co- lonias grises sin hemólisis
20	Agar nutricio	Colonias amarillen- tas, a veces irregu- larmente conforma- das, debido al rápi- do crecimiento
25	Púrpura-suero de caballo- agar	Colonias débilmente amarillas, con 1,3 mm de diámetro. Cre- cimiento moderadamen- te coherente
	Agar MacConcey Nº 3 (Oxoid)	Ningún crecimiento
30	Agar C.L.E.D.	Colonias amarillo pálido sobre un fondo débilmente amarillo

1	Agar DNasa	Colonias amarillentas. Ningún crecimiento confluyente. Después de acidificación con HCl 1 N, débil actividad de DNasa reconocible
5		

La cepa *Staphylococcus aureus* I.J.7 presenta los siguientes rendimientos de metabolismo:

Fermentación de

10	Dextrosa	+	después de 6 días	a 37°C
	Lactosa	+	" " 6 "	" 37°C
	Sacarosa	+	" " 6 "	" 37°C
	Maltosa	+	" " 6 "	" 37°C
	Ramnita	+	" " 6 "	" 37°C
15	Salicina	-	" " 13 "	" 37°C
	Inulina	-	" " 13 "	" 37°C
	Esculina	-	" " 13 "	" 37°C

Licuección de

20	Gelatina	+	después de 13 días	a 22°C y 37°C
----	----------	---	--------------------	---------------

Ya en el procedimiento de fermentación, según el cual se obtiene la masa de bacterias, hay que procurar una buena aptitud para suspensión de las bacterias y un rendimiento suficiente respecto a la actividad de aglutinación. Así, es conveniente llevar a cabo la reproducción de las bacterias en un medio que consta esencialmente de una solución acuosa de peptona de carne, ácido láctico o sus sales, vitaminas y glucosa, iones de metales alcalinos y alcalinotérricos, ventajosamente en forma de sus sales fisiológicamente

1 te compatibles, tales como cloruros, sulfatos y fosfatos.
Las bacterias reproducidas en frascos, recipientes a pre-
sión o fermentadores, separadas del medio nutricio por fil-
tración o centrifugación, son estorbadas en su capacidad de
5 reproducción por medidas que reduzcan lo menos posible la
actividad del factor de aglutinación. De modo acreditado y
conocido, la muerte de las bacterias se realiza por calenta-
miento a aproximadamente 60-70°C durante 30-90 minutos.

El efecto esencialmente estabilizador de la sus-
10 pensión de estafilococos activos frente al factor de agluti-
nación, se encuentra en el contenido de 3-50 % de un alcohol
plurivalente en el medio de suspensión. Por tal alcohol hay
que entender, en el sentido de la presente invención, com-
puestos con un esqueleto hidrocarbonado, de preferencia un
15 esqueleto hidrocarbonado alifático, en el que varios átomos
de carbono vecinos llevan cada uno un grupo hidroxilo, y que
comprenden un intervalo de pesos moleculares desde aproxima-
damente 90 hasta aproximadamente 500 000. Los compuestos más
sencillos de esta clase de sustancias son el alcohol divalen-
20 te glicol y el alcohol trivalente glicerina. Efectos estabi-
lizadores ventajosos los muestran también, por ejemplo, los
representantes de los alcoholes hexavalentes, tal como manni-
ta, y de los hidratos de carbono, tal como glucosa. Junto a
los compuestos de bajo peso molecular, son utilizables según
25 la invención también los glicoles macromoleculares, tales
como el poli(etilenglicol), para la estabilización de la sus-
pensión. Propiedades especialmente ventajosas las presentan
además hidratos de carbono, en especial sus representantes
macromoleculares, que pueden ser de origen tanto natural co
30 mo también sintético. Como ejemplos de ellos se mencionarán

1 el polímero de glucosa dextrano, existente en la naturaleza, o el polisacárido sintético preparado a partir de azúcar de caña, que es obtenible en el comercio como Ficoll^(R) (marca registrada de la firma Pharmacia Upsala).

5 Una condición previa para la posibilidad de utilización de los alcoholes plurivalentes es su solubilidad en la solución acuosa tamponada, a la que eventualmente se pueden añadir sales neutras, para preparar un medio aproximadamente isotónico para las células de los microorganismos a
10 suspender.

La suspensión de estafilococos se ajusta al valor de pH deseado, convenientemente con ayuda de una sustancia tampón, tal como las que se utilizan habitualmente en trabajos bioquímicos. Sustancias tampón adecuadas para ello son,
15 por ejemplo, las que han sido descritas por Good y otros en Biochemistry 5, 472 (1966). La concentración de las bacterias, que están suspendidas en la solución acuosa tamponada, que contiene el alcohol plurivalente, es de $1-20 \times 10^{10}$ ml, en el caso de que la suspensión de estafilococos tenga
20 que ser utilizada directamente en el procedimiento de ensayo para la determinación de productos de desdoblamiento de fibrinógeno y/o de fibrina. No obstante, la estabilidad del factor de aglutinación está también garantizada, aunque la densidad de bacterias esté esencialmente elevada o disminuída respecto al valor indicado.
25

Objeto de la invención es además el procedimiento para la estabilización del factor de aglutinación ligado a microorganismos, caracterizado porque los microorganismos formadores del factor de aglutinación, de preferencia estafilococos, cultivados según un procedimiento conocido, son
30

1 muertos con mantenimiento del factor de aglutinación, son
suspendidos homogéneamente en una solución acuosa tampona-
da a pH 7,0 a 7,7, de preferencia 7,3 a 7,5, con un conte-
nido de 3-50% de un alcohol plurivalente. Naturalmente no
5 hay ninguna razón que impida añadir a la suspensión de mi-
croorganismos estabilizada según la invención, otras sus-
tancias conocidas de la bioquímica, y en especial por la
enzimocómica, que producen o activan la actividad enzimá-
tica, tales como por ejemplo proteínas, en especial albúmi-
10 na o productos de degradación de gelatina. Para impedir una
contaminación microbiana, a la suspensión se le puede aña-
dir un agente antimicrobiano, por ejemplo un antibiótico.

Otro objeto de la invención es un reactivo para
el reconocimiento de productos de desdoblamiento de fibri-
nógeno y/o de fibrina, que como componente esencial contie-
15 ne 1 - 20 x 10¹⁰ bacterias/ml, de microorganismos positivos
frente al factor de aglutinación, homogéneamente suspendidos
en una solución acuosa tamponada, que contiene un alcohol
plurivalente, y el procedimiento para su preparación.

20 Objeto de la invención es finalmente la utiliza-
ción de la suspensión estable de estafilococos para la de-
terminación de productos de desdoblamiento de fibrinógeno
y/o de fibrina en líquidos corporales, de preferencia en
plasma o suero, por procedimientos conocidos. La determina-
25 ción de los productos de desdoblamiento de fibrinógeno y/o
de fibrina se lleva a cabo, por ejemplo, mezclando el suero
a ensayar, del que se prepara una serie de diluciones, con
una cantidad constante, ventajosamente una cantidad igual,
de la suspensión de estafilococos según la invención, des-
30 pués de lo cual en el espacio de pocos minutos, se registra

1 la máxima dilución de suero, que tiene aún una aglutinación
positiva de las bacterias. Si este valor se pone en rela-
ción con un valor obtenido por dilución de suero de perso-
nas sanas, se puede comprobar según ello el resultado como
5 desviación del valor normal.

La determinación se realiza de modo conocido en
la forma más sencilla sobre un portaobjetos, sobre el que
se mezclan a partes iguales los participantes en la reac-
ción.

10 La invención se va a ilustrar más detalladamente
en el ejemplo siguiente.

Ejemplo

15 Preparación de la suspensión de bacterias

Staphylococcus aureus I.J.7 (ATCC 31153) se reproduce has-
ta una concentración de 15×10^8 bacterias por ml, en un
medio con la composición siguiente

20	peptona de carne	80,0 g
	solución de lactato de sodio, al 50 %	25,0 ml
	cloruro amónico	18,5 g
	sulfato de magnesio (7 H ₂ O)	0,8 g
	hidrogenofosfato dipotásico	4,0 g
	dihidrogenofosfato potásico	4,0 g

25 completado a 4 litros con agua, y provisto con los aditivos
siguientes

1	D(+)	biotina	0,02 mg
	D(+)	-pantotenato de calcio	1,00 mg
		cloruro de colina	0,08 mg
		ácido fólico	0,20 mg
5		meso-inosita para fines bioquímicos y microbiológicos	0,08 mg
		ácido nicotínico	6,00 mg
		clorhidrato de piridoxal	0,50 mg
		riboflavina	0,72 mg
10		dicloruro de tiaminio	2,448 mg
		glucosa	10 g

Después de ello el fermentador, en el que se había realizado la reproducción, es calentado a 70°C durante 90 minutos. Las bacterias se obtienen con ayuda de una centrifuga a 6500 rpm. El medio nutricio que sobrenada es desechado y las bacterias son suspendidas y centrifugadas varias veces en solución isotónica de sal común. Finalmente las bacterias centrifugadas son suspendidas en una solución tampón con la composición siguiente.

0,1 M/l de tris-hidroximetil-aminometano
0,3 M/l de cloruro de sodio
0,02 % de cloramfenicol
0,02 % de albúmina humana

25

El valor del pH de la solución se ajusta a 7,4 con ácido clorhídrico 1 N, después de lo cual se añade a una parte en volumen de la solución tampón una parte en volumen de glicerina. Después de ello se ajusta la densidad de bacterias de la suspensión a 1×10^{11} /ml.

30

1 La suspensión obtenida presenta en el siguiente sistema de ensayo un resultado constante durante 12 meses:

5 1º.- Obtención de un suero de una persona normal sana

5 ml de sangre recién extraída se mezclan cuidadosamente con 0,1 ml de un inhibidor polivalente de proteínas, correspondientes a 10 unidades de entiplasmina, y 0,1 ml de una solución de trombina, correspondientes a 10 unidades NIH. La mezcla se incuba durante 2 horas a 37°C, y a continuación el suero que sobrenada es separado del coágulo de sangre formado, por centrifugación.

10 2º.- Formulación de ensayo

15 Con utilización de tampón 0,1 M de tris-hidroximetilaminometano-ácido clorhídrico de valor de pH 7,4 se prepara una serie geométrica de diluciones del suero, de modo que resulta una dilución de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, etc. Cada vez 0,05 ml de las diluciones de suero se mezclan con 0,05 ml de la suspensión de estafilococos preparada según el ejemplo precedente, sobre un portaobjeto. Se hace girar la mezcla cuidadosamente durante 2 minutos, y se interpreta la reacción de aglutinación contra un fondo negro. Puede reconocerse una aglutinación hasta una dilución de 1:256. Se obtiene el mismo resultado si en lugar el tampón con 50 % de glicerina utilizado, como se ha indicado en el ejemplo, se mezcla con las sustancias siguientes.

	Sustancia	% en peso	Peso molecular
1	Glicerina	33	92
	Glucosa	10	180
	Mannita	3	182
5	Mannita	10	182
	Mannita	15	182
	Poli(etilenglicol)	3	4000
	Poli(etilenglicol)	10	4000
	Dextrano	3	40000
10	Dextrano	10	40000
	Dextrano	3	250000
	Dextrano	10	250000
	Ficoll	3	70000
	Ficoll	10	70000
15	Ficoll	3	400000
	Ficoll	10	400000

20

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Procedimiento para la estabilización del factor de aglutinación ligado a microorganismos, caracterizado porque los microorganismos formadores del factor de aglutinación son cultivados según un procedimiento conocido, son

30

1 muertos con obtención del factor de aglutinación, y suspen-
didos homogéneamente en una solución acuosa tamponada con
valor de pH 7,0 a 7,7, con un contenido de 3-50% de por lo
menos un alcohol plurivalente soluble en ella.

5 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª,
caracterizado porque como microorganismos positivos frente
al factor de aglutinación se utilizan bacterias de Staphylo-
coccus aureus positivas frente al factor de aglutinación.

10 3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª
y 2ª, caracterizado porque como microorganismos positivos
frente al factor de aglutinación se utilizan bacterias de
Staphylococcus aureus I.J. 7 (ATCC 31153).

15 4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª
3ª, caracterizado porque el peso molecular de alcohol plu-
rivalente está en el intervalo entre 90 y 500.000.

5ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª
a 4ª, caracterizado porque la suspensión contiene un número
de bacterias de $1 - 20 \times 10^{10}$ bacterias/ml.

20 6ª.- Procedimiento para la estabilización del fac-
tor de aglutinación ligado a microorganismos.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, 09 JUL 1977

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder,
