

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



(10) ES	(11) NUMERO	(10) A 1
(21)	453609	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
691.915	1.6.1976	U.S.A.

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N31/02, 33/16	

(54) TITULO DE LA INVENCION
"METODO PARA PREPARAR UN REACTIVO QUE SE AGLUTINA AL PONERSE EN CONTACTO CON FLUIDOS QUE CONTIENEN GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA"

(71) SOLICITANTE (S)	La Compañia Norteamericana; WARNER-LAMBERT COMPANY
----------------------	---

DOMICILIO DEL SOLICITANTE	201 Tabor Road MORRIS PLAINS, NEW JERSEY 07950 (U.S.A.)
---------------------------	--

(72) INVENTOR (ES)	1.- Gail Hoff, norteamericano, 2.- Metka Prevorsek, norteamericano.
--------------------	--

(73) TITULAR (ES)	
-------------------	--

(74) REPRESENTANTE	D. FRANCISCO GARCIA CABRERIZO	N/REF: O.G. 32211/AS
--------------------	--------------------------------------	-----------------------------

Las pruebas de aglutinación directa que forman la base de la presente invención son bien conocidas en cuanto a la teoría por la que trabajan. La patente estadounidense número 3171783 de Fisk describe tales pruebas de diagnóstico pero indica que las mismas no son aconsejables para su utilización debido a una falta de sensibilidad.

La presente invención ha resuelto muchas de las dificultades descritas en la técnica anterior. Cuando se realiza la prueba del embarazo por aglutinación directa usando los métodos y materiales mencionados, se consigue la sencillez y precisión sugeridas por los métodos de aglutinación clásicos.

Por otra parte, la prueba de esta invención, cuando es usada con el reactivo y método descritos, es del 100% - 600% más sensible que las pruebas de aglutinación directa de la técnica anterior de que se dispone comercialmente.

Igualmente, utilizando el sistema tampón específico descrito como parte del sistema de reactivo, se comprobó en forma inesperada que eran minimizadas las reacciones positivas falsas.

Se ha comprobado que la determinación del embarazo puede realizarse de una manera rápida y precisa con el equipo más simple por medio de la presente invención.

La gonadotropina coriónica humana (HCG) está presente en la sangre y orina de las mujeres embarazadas. Esta hormona es generada durante la formación del feto y alcanza su nivel más alto entre el día 50 y el 90 después del primer día del último ciclo menstrual. La detectabilidad de la HCG como indicación positiva del embarazo es posible a partir de aproximadamente el día 40 usando la presente invención.

Consiste en un método perfeccionado para determinar



- el embarazo por una simple aglutinación de una suspensión de partículas de látex de poliestireno que tiene un tamaño de -- partículas del orden de 0,15 a 0,9 micras, preferiblemente de 0,36 micras, que ha sido sensibilizada con una fracción de glo
5. bulina de anti-suero para la HCG por incubación del látex con globulina de suero en agua por espacio de dos horas aproximadamente y añadiendo después un mismo volumen de una solución ligeramente ácida tamponada a un pH de 6,4 usando un agente tampón de 0,5M dihidrocloruro de piperacina-NaOH conteniendo de --
10. 0,0025 a 0,1M, preferiblemente 0,02M de glicina, 6% de NaCl y 1 parte de mertiolato por 5.000 partes de mezcla de agente tampón. La glicina puede ser sustituida por glicilglicina en las mismas cantidades.

- Se ha realizado varias sugerencias en la técnica anterior relativas a las pruebas de aglutinación directa para la
15. determinación del embarazo pero generalmente las mismas han resultado ser equivocadas. La patente de Fisk citada anteriormente comprende el uso de placas de agar impregnadas de anti-suero de HCG. En el procedimiento Fisk, se concentra una muestra
20. de orina desconocida por adsorción sobre caolín, se eluye la totalidad de la posible HCG y siguiendo técnicas de agar -- bien conocidas, se desarrolla la prueba sobre una placa de agar durante un período de cuatro horas.

- Otra prueba descrita como simple y rápida está expuesta en la patente estadounidense nº 3.309,275 concedida a Treacy. Esta patente consiste en la sensibilización de un látex con HCG por calentamiento del látex mezclado con HCG durante un período de cuatro a seis semanas. Toda la HCG presente en una muestra de orina, al ser mezclada con cantidades conocidas de anti
25. suero de HCG, neutralizaría al anti-HCG si la persona que faci
- 30.



litó la muestra estuviese embarazada. Se realiza entonces la prueba de Treacy y, en caso de embarazo, no tendría lugar la aglutinación del látex.

EJEMPLO I

5. Globulina de gonadotropia coriónica anti-humana de conejo.

Se extrae una determinada cantidad de sangre de conejos que fueron pre-sensibilizados a la HCG. Se deja coagular la sangre a temperatura ambiente y se retira el suero entonces de la porción coagulada y se enfría a 4°C. Todos los reactivos usados en la preparación han sido enfriados también a 4°C.

10.

El suero es fraccionado por adición de una solución de sulfato amónico saturado en una cantidad que dé una solución al 40% de sulfato amónico después de haber sido realizada la adición. El precipitado que se forma cuando se añade el sulfato amónico contiene anti-HCG y es recogido por filtración, cen-

15.

trifugación u otros medios, y el material flotante es desechado. El precipitado es suspendido de nuevo en una solución de lavado de 40% de sulfato amónico saturado para retirar todas las trazas de los contaminantes flotantes. El precipitado es

20.

recogido nuevamente y disuelto en una solución de cloruro sódico al 0,85% en peso en una cantidad que dé una concentración de anti-HCG del 40% aproximadamente de su concentración original en suero entero. Esta solución es refinada adicionalmente dializándola contra una solución de cloruro sódico al 0,85%.

25.

El dializado así obtenido puede ser usado inmediatamente o congelado a -20°C para su posterior utilización.

EJEMPLO II

Suspensión de látex de poliestireno al 2%

Se suspende partículas de látex de poliestireno, que tienen un tamaño de partícula comprendido entre 0,15 y 0,9 mi-

30.



cras aproximadamente, en una cantidad suficiente de agua destilada para obtener la concentración deseada. Aunque no es necesario, resulta ventajoso que la concentración sea confirmada por valoración colorimétrica.

5. EJEMPLO III

Reactivo de anti-HCG-látex

Se añade 25 cc. de un agente tampón de dihidrocloruro de piperacina a un pH de 6,4, conteniendo 0,02M de ácido aminoacético, 6% de cloruro sódico, y de 1:5000 a 1:15000 de mertiolato (thimerosal), a 25 cc. de agua destilada y se calienta a 50°C. Se añade rápidamente 50 cc. de la suspensión de látex preparada de acuerdo con el ejemplo II a aproximadamente 8 cc. de globulina de anti-HCG preparada de acuerdo con el ejemplo I y se incuba la mezcla a 56°C por espacio de dos horas aproximadamente. Después de la incubación, se añade al reactivo sucrosa en una cantidad aproximada del 0,5 al 20%, preferiblemente del 1 al 3% aproximadamente, y albúmina de suero bovino en una cantidad aproximada del 0,1 al 20% preferiblemente del 0,1 al 1,0% aproximadamente. Después de la mezcla completa se enfría el reactivo y se almacena a 4°C. El reactivo así preparado es estable por espacio de hasta tres años a 4°C.

El sulfato amónico saturado que precipita el anti-sue-ro para la HCG (ejemplo I) puede ser añadido en cantidades tales que su concentración resultante en combinación con el suero esté comprendida entre el 33 y 60% saturada, preferiblemente entre el 40 y 50% saturada.

Se prefiera la temperatura de 56° a la que es incubado el látex (ejemplo III), pero la misma no es crítica y puede variar en ambos sentidos efectuando los ajustes correspondientes en la duración de la incubación, es decir alargándola para



las temperaturas más bajas y acortándola para las más altas.

5. La cantidad de anti-HCG añadida al látex (ejemplo - III) es controlada de manera que las partículas queden completamente revestidas solamente. Ello elimina la necesidad de -- efectuar un lavado repetido que es necesario para retirar todo el exceso de globulina no adsorbida del reactivo.

10. El sistema tampón (ejemplo III) utilizado en el sistema de reactivo permite usar el reactivo con especímenes de suero, así como en las pruebas de orina convencionales. Igualmente, minimiza las reacciones positivas falsas debido al factor reumatoide de los sueros. Finalmente, permite llevar a cabo también la prueba del embarazo con muestras de orina que -- contienen cantidades límite de sangre o proteína.

15. La adición de la sucrosa en albúmina de suero bovino (ejemplo III) pudo comprobarse que no sólo hacía un mejor preparado para distinguir las reacciones positivas de las negativas, sino que además permite disponer el reactivo sobre -- tarjetas y secarlo, dando así a los reactivos una estabilidad más larga a temperatura ambiente.

20. EJEMPLO IV

Tarjetas de ensayo secadas

25. Se dispone 50 lamda de la suspensión de reactivos -- fabricada de acuerdo con el ejemplo III sobre diapositivas de sechables que pueden ser de cristal, plástico, cartulina, u -- otro material. Se deja secar este reactivo sobre las diapositivas a temperatura ambiente después de lo cual está listo para su uso en el procedimiento de la prueba del embarazo que se ha expuesto en el ejemplo V.

EJEMPLO V

30. Procedimiento de prueba del embarazo



Se recoge la orina de la paciente y se filtra para retirar el material contaminante. La filtración es llevada a cabo preferiblemente usando el dispositivo de la patente estadounidense nº 3.698.556, no obstante, podría usarse otros medios de filtración para filtrar igualmente la muestra.

Se dispone una gota de orina filtrada sobre una diapositiva de cristal transparente y se mezcla con una gota del reactivo de látex preparado de acuerdo con el ejemplo III. Se hace oscilar ligeramente a la diapositiva por espacio de dos minutos aproximadamente. Si la muestra de orina contiene HCG, se forman partículas discretas o bloques de látex fácilmente discernibles por la vista; si la orina no contiene HCG el látex continúa pareciendo como una suspensión uniforme.

Evidentemente, puede usarse suero en el procedimiento anterior en lugar de la orina filtrada. La gota de orina o suero puede ser echada también sobre las tarjetas de ensayo fabricadas de acuerdo con el ejemplo IV en lugar de las diapositivas de cristal transparente, evitando así la necesidad de añadir una gota del reactivo de látex.

Se realizaron ensayos con 215 mujeres embarazadas y 414 no embarazadas sobre muestras de orina usando los materiales y el método de la presente invención. El tiempo demostró que los resultados obtenidos fueron de una precisión del 99,3%.

El reactivo y el sistema de ensayo resultó ser también sensible (ejemplo IV) a cantidades tan pequeñas como aproximadamente 1,0 IU de HCG por ml. de orina.

EJEMPLO VI

Comparación con las pruebas del embarazo comerciales

Se evaluó la sensibilidad de 13 pruebas de embarazo comerciales usando cantidades conocidas de gonadotropina coriónica



nica humana (HCG) disueltas en orina de una mujer no embarazada. Siete estaban basadas en el principio de la inhibición de aglutinación del latex (pruebas de diapositiva indirecta), una era un tubo de ensayo que usaba el mismo principio, tres estaban -

5. basadas en el principio de la inhibición de hemaglutinación pasiva (HAI) y tres, incluyendo nuestra prueba, estaban basadas en una aglutinación directa del látex.

Gonadotropia coriónica humana (HCG): Preparación A - sin orina, División Biological Standards, National Institute of Health, Bethesda, Maryland. Se disolvió el contenido de un vial

10. conteniendo 5000 i.u. de HCG en 5 ml. de agua destilada para dar una concentración de 1000 i.u./ml. Se realizaron más diluciones por duplicado en orinas filtradas de mujeres no embarazadas a concentraciones que iban de 10 i.u./ml. hasta 0,6 i.u./

15. ml. De este modo estaban contenidas concentraciones conocidas de HCG en niveles diferentes.

Se recogió orina de mujeres no embarazadas y se filtró a través de Whatman 42 y papel DE81. Se retiró una alícuota de cada como control "negativo" para las pruebas de embarazo y el resto fue usado para preparar diluciones de HCG.

20.

Según se muestra en la Tabla I, la sensibilidad alcanzada usando la norma NIH para HCG iba de 0,6 I.U./ml. hasta 5 I.U./ml.

25.

30.

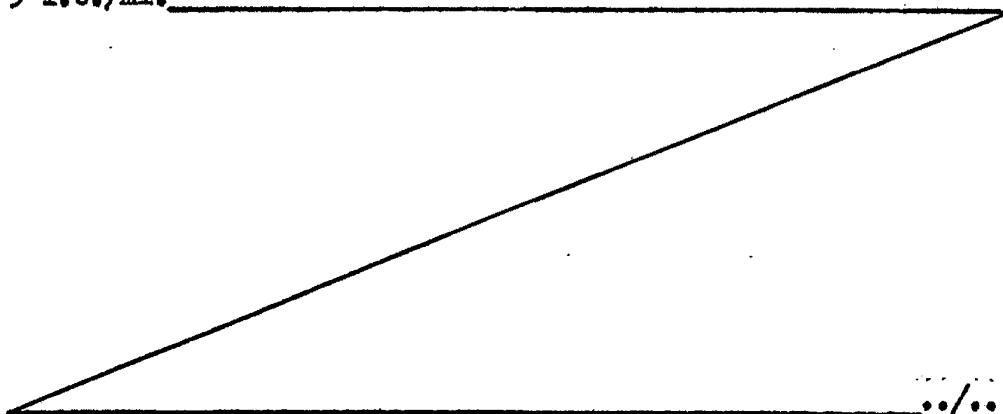




TABLA I

Sensibilidad de las Pruebas del Embarazo

	Nombre	Tipo	Reivindicación de Sensibilidad (i.u./ml.)	Sensibilidad hallada (i.u./ml.)
5.	A	LDS ¹	no declarada	3-4
	B	LIS ²	1.5 - 2.5	2.5 - 5
	C	LIS	2	2.5 - 5
	D	LIS	3	2.5 - 5
10.	E	LIS	3.5	2.5 - 5
	F	LIS	1-2	1.25 - 2.5
	G	LIS	1-2	1.25 - 2.5
	H	LIT ³	1	<0.6
	I	LDS	2	1.25 - 2.5
15.	De acuerdo con esta invención	LDS	1	0.6 - 1.25
	J	HAI ⁴	0.75	0.6 - 1.25
	K	HAI	0.75	<0.6
	L	HAI	1	<0.6

20. ¹Prueba de diapositiva directa de látex
²Prueba de diapositiva indirecta de látex
³Prueba de tubo indirecto de látex
⁴Inhibición de hemaglutinación (prueba de tubo)

Aunque se ha descrito una realización preferida de -
 25. la invención, se comprenderá que puede introducirse varios --
 cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance
 de la presente invención tal como queda definida por las rei-
 vindicaciones que siguen.

N O T A

30. La patente de invención que se solicita por veinte

años, para España, de acuerdo con la vigente legislación, deberá recaer sobre: "METODO PARA PREPARAR UN REACTIVO QUE SE AGLUTINA AL PONERSE EN CONTACTO CON FLUIDOS QUE CONTIENEN GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA", con Prioridad de la solicitud de Patente en U.S.A. nº 691.915 de fecha 1 de Junio de 1976, según las características esenciales de las siguientes: _____

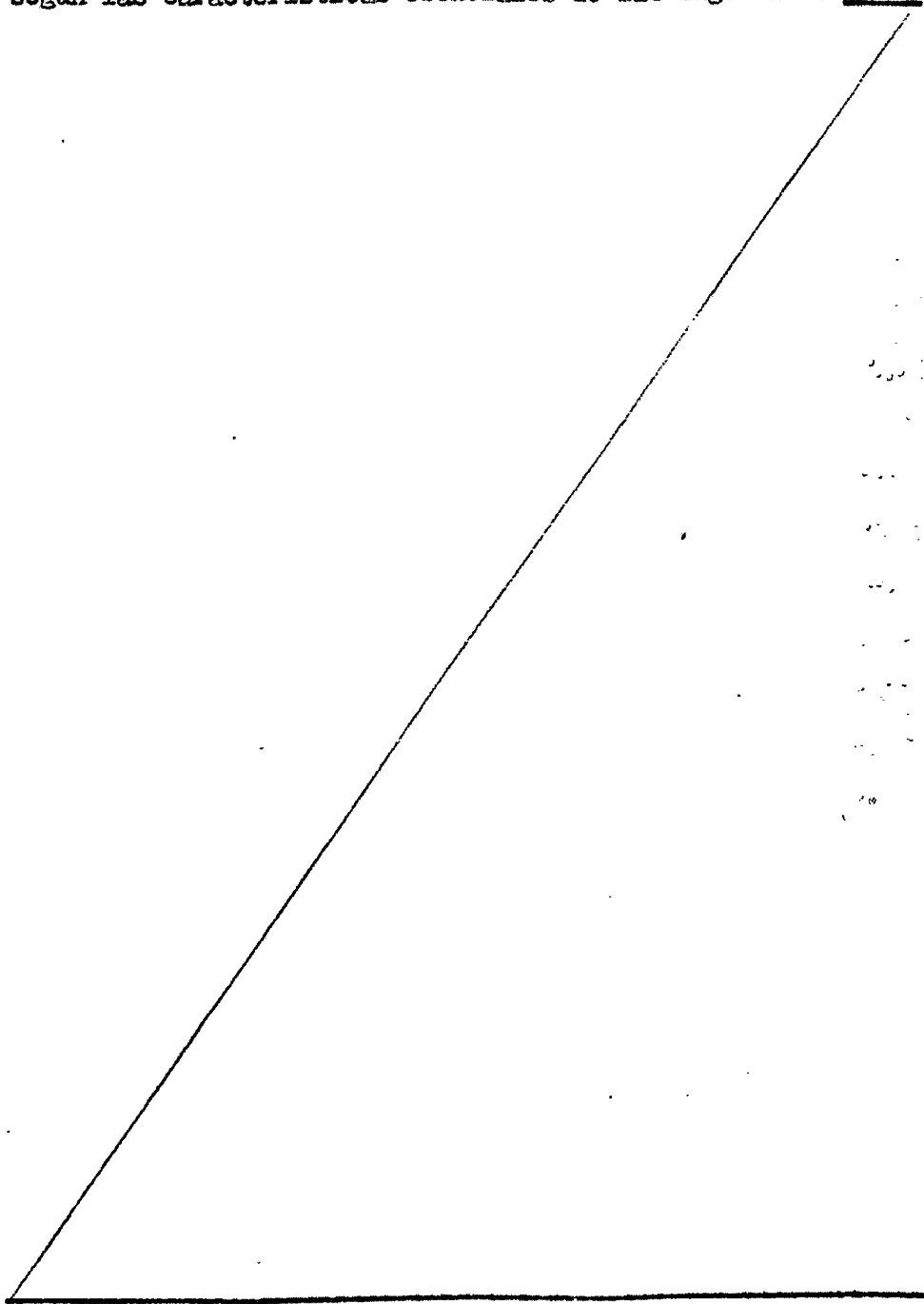
10.

15.

20.

25.

30.



REIVINDICACIONES

- 1.- Método para preparar un reactivo que se aglutina al ponerse en contacto con flúidos que contienen gonadotropina coriónica humana, consistente en: inyectar a un conejo -
5. una determinada cantidad de gonadotropina coriónica humana y dejar que el conejo produzca anti-cuerpos para la gonadotropina coriónica; retirar una parte de la sangre de dicho conejo y dejar que la sangre sufra las reacciones normales de coagulación; separar el suero del coagulo; precipitar la porción -
10. de globulina de dicho suero mediante la adición de una solución del sulfato amónico del 35 al 60% aproximadamente; purificar el precipitado para retirar todas las trazas de contaminantes flotantes; disolver el precipitado en una solución salina normal; mezclar la solución de globulina así obtenida
15. con partículas de látex de poliestireno que tienen un tamaño comprendido entre 0,15 y 0,9 micras aproximadamente; incubar dicha mezcla a 56° aproximadamente; añadir una cantidad de -
20. 0,005 a 1M de agente tampón de dihidrocloruro de piperacina - que tiene un pH de 5,0 a 8,6 y conteniendo de 0,0025 a 0,1M - de ácido aminoacético y de 1 a 10% en peso de cloruro sódico; incubar dicha mezcla durante un tiempo adicional; y añadir -
25. sucrosa a dicha mezcla en una cantidad aproximada del 0,5 al 20% y albúmina de suero bovino en una cantidad del 0,1 al -
30. 20% aproximadamente.
- 2.- Método para preparar un reactivo que se aglutina al ponerse en contacto con flúidos que contienen gonadotropina corónica humana según la reivindicación 1, que consiste además en añadir una cantidad de reactivos así preparados a -
- una diapositiva desechable; y secar el reactivo sobre dicha -
- diapositiva.

3.- "MÉTODOS PARA PREPARAR UN REACTIVO QUE SE AGLU-
TINA AL PONERSE EN CONTACTO CON FLUIDOS QUE CONTIENEN CONADO
PROTEINA CORIONICA HUMANA".

Según queda sustancialmente descrito en la presen-
5. te Memoria que consta de once hojas, escritas a máquina por
una sola cara.

Madrid, 15 DIC. 1977

WARREN-LAMBERT COMPANY

P.P.

FRANCISCO GARCIA CABRERIZO
P.P.

Firmado: M.^a Dolores Jerquera